



**Marina
Pereira
Crespo**

**Impacto do fogo na matéria orgânica do solo –
Caraterização estrutural**



**Marina
Pereira
Crespo**

Impacto do fogo na matéria orgânica do solo – Caraterização estrutural

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química com especialização em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica do Doutor Valdemar Esteves, Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Valdemar Inocêncio Esteves

Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Mário Miguel Azevedo Cerqueira

Professor auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao meu orientador pelo apoio e disponibilidade demonstrada durante o decorrer do trabalho.

À Ana Moreira, António Pinto e Sérgio Santos pela ajuda que me deram quando precisei de tirar dúvidas.

À minha família, em especial, à minha mãe e à minha avó, as duas pessoas que mais me ajudaram e apoiaram durante o mestrado.

Às pessoas que conviveram comigo em Aveiro durante o mestrado, em especial, à Ana Moreira e à Vera Granado, pela amizade demonstrada.

palavras-chave

Fogo florestal, matéria orgânica, substâncias húmicas, ácidos húmicos.

resumo

As substâncias húmicas são a componente mais abundante da matéria orgânica do solo e desempenham papéis relevantes nos ecossistemas. É sabido que os fogos florestais alteram a estrutura e composição dos solos. Por isso, neste trabalho fez-se o estudo do impacto dos fogos na estrutura e propriedades dos ácidos húmicos dos solos. O local estudado foi uma floresta em Ermida, Portugal, e as amostras de solo queimado e não queimado foram recolhidas de duas camadas: 0-2 e 2-5 cm. Os procedimentos de extração e fracionamento foram realizados de acordo com o método recomendado pela IHSS. As amostras foram caracterizadas por termogravimetria (TG), análise elementar, e espectroscopia de ultravioleta e visível (UV-Vis), infravermelho (FT-IR), ressonância magnética nuclear ^{13}C de estado sólido (CP-MAS ^{13}C RMN) e fluorescência molecular. Na camada mais superficial (0-2 cm) os resultados dos solos queimados mostraram uma descida significativa de grupos alquilo e também uma diminuição em O-alquilo e um aumento da aromaticidade. O fogo não teve efeito significativo nos ácidos húmicos do solo queimado da camada 2-5 cm.

keywords

Forest fire, organic matter, humic substances, humic acids.

abstract

The humic substances are the most abundant component of soil organic matter and play relevant roles in ecosystems. It's known that forest fires change structure and composition of soils. Therefore, the impact of forest fires on the structure and properties of humic acids from soil was studied. The studied site is a forest in Ermida, Portugal, and the samples of burnt and non-burnt soil were sampled from two layers: 0-2 and 2-5 cm. The extraction and fractionation procedures were achieved using the recommended method by IHSS. The samples were characterized by thermogravimetry (TG), elemental analysis, and ultraviolet and visible (UV-Vis), infrared (FT-IR), solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (CP-MAS ^{13}C NMR) and molecular fluorescence spectroscopies. In the most superficial layer (0-2 cm) the results of burnt soils showed a significant decrease of alkyl groups and also a decrease in O-alkyl and an increase in the aromaticity. The fire didn't have a significant effect on humic acids of burnt soil from the layer 2-5 cm.

Índice

Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii

1. Introdução.....	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Objectivo do trabalho.....	2
1.3 Matéria orgânica do solo.....	2
1.3.1 Importância da matéria orgânica do solo.....	3
1.4 Substâncias húmicas.....	5
1.4.1 Formação das substâncias húmicas.....	8
1.4.2 Composição e estrutura das substâncias húmicas.....	11
1.5 Efeito do fogo na matéria orgânica do solo.....	19
1.6 Extracção de substâncias húmicas do solo.....	25
1.7 Caracterização de substâncias húmicas.....	35
1.7.1 Termogravimetria.....	35
1.7.2 Análise elementar.....	36
1.7.3 Espectroscopia de UV-Visível.....	37
1.7.4 Espectroscopia de infravermelho.....	38
1.7.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	40
1.7.6 Espectroscopia de fluorescência molecular.....	41
2. Materiais e métodos.....	44
2.1 Amostragem do solo.....	44
2.2 Extracção e fraccionamento dos ácidos húmicos.....	45
2.3 Purificação dos ácidos húmicos.....	45
2.4 Quantificação dos ácidos húmicos.....	46
2.5 Caracterização dos ácidos húmicos.....	46

2.5.1	Termogravimetria.....	46
2.5.2	Análise elementar.....	47
2.5.3	Espectroscopia de UV-Visível.....	47
2.5.4	Espectroscopia de infravermelho.....	47
2.5.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	47
2.5.6	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	48
3.	Resultados e discussão.....	49
3.1	Termogravimetria.....	49
3.2	Análise elementar.....	52
3.3	Espectroscopia de UV-Visível.....	54
3.4	Espectroscopia de infravermelho.....	55
3.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	60
3.6	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	64
4.	Conclusões.....	67
5.	Referências bibliográficas.....	69

Lista de figuras

Figura 1.1 – Esquema da divisão das substâncias húmicas de acordo com a sua solubilidade (adaptado de Pena-Mendéz <i>et al.</i> , 2005).....	7
Figura 1.2 – Mecanismos de formação das substâncias húmicas (adaptado de Stevenson, 1994).....	9
Figura 1.3 – Modelo da estrutura dos ácidos húmicos de acordo com Stevenson (1982).....	14
Figura 1.4 – Modelo da estrutura dos ácidos húmicos proposto por Schulten e Schnitzer (1995) (Jones e Bryan, 1998).....	15
Figura 1.5 – Modelo da estrutura dos ácidos fúlvicos de acordo com Buffle <i>et al.</i> (1977).....	17
Figura 1.6 – Espectro de massa LDI TOF de ácidos húmicos do solo (Pena-Mendéz <i>et al.</i> , 2005).....	17
Figura 1.7 – Estrutura hipotética de uma porção da macromolécula de ácidos húmicos. A estrutura foi construída com um software de modelação molecular. Mostra um arranjo tridimensional parcial de energia mínima, que inclui na estrutura partes semelhantes à lenhina (principalmente a parte central do modelo) e alguns componentes como os polissacarídeos e resíduos de proteína (Chesworth, 2008).....	18
Figura 1.8 – Processos hipotéticos que ocorrem na matéria orgânica de um solo afetado por um fogo severo (González-Pérez <i>et al.</i> , 2004).....	22
Figura 1.9 – Método de extração sugerido pela IHSS (Oliveira, 2009).....	29
Figura 1.10 – Preparação da amostra de ácidos húmicos pelo método da IHSS.....	31
Figura 1.11 - Preparação da amostra de ácidos fúlvicos pelo método da IHSS.....	32
Figura 2.1 – Esquema de recolha das amostras em estudo (Faria, 2009).....	44
Figura 3.1 – Termograma da amostra de solo não queimado da camada 2 a 5 cm (SNQ25).....	49
Figura 3.2 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo queimado da camada 0 a 2 cm (SQ02).....	50
Figura 3.3 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo queimado da camada 2 a 5 cm (SQ25).....	50
Figura 3.4 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo não queimado da camada 0 a 2 cm (SNQ02).....	50

Figura 3.5 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo não queimado da camada 2 a 5 cm (SQN25).....	51
Figura 3.6 – Espectros de UV-Vis (divididos pelas respectivas massas, mg) das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).....	54
Figura 3.7 – Espectros de FTIR das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).....	56
Figura 3.8 – Espectros de FTIR das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25). Gama 3600-2700 cm ⁻¹	59
Figura 3.9 – Espectros de FTIR das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25). Gama 1800-900 cm ⁻¹	59
Figura 3.10 – Espectros de RMN de ¹³ C das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).....	61
Figura 3.11 – Espectros de emissão com excitação a 360 nm das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).....	64
Figura 3.12 – Espectros síncronos com $\Delta = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60$ nm das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).....	65

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Propriedades gerais do húmus e efeitos associados no solo (adaptado de Stevenson, 1994).....	4
Tabela 1.2 – Distribuição da matéria orgânica do solo (aproximadamente) em diferentes componentes (adaptado de Stevenson e Cole, 1999).....	5
Tabela 1.3 – Variações típicas da composição elementar para ácidos húmicos e ácidos fúlvicos do solo (adaptado de Killops e Killops, 2005).....	12
Tabela 1.4 – Abundância estimada dos grupos funcionais (mequiv g ⁻¹) nos ácidos húmicos e fúlvicos do solo (adaptado de Killops e Killops, 2005).....	13
Tabela 1.5 – Sumário dos efeitos dos fogos nas propriedades dos solos florestais (Certini, 2005).....	24
Tabela 1.6 – Reagentes usados para a extracção de constituintes orgânicos do solo (Stevenson, 1994).....	26
Tabela 1.7 – A influência do pH no consumo de O ₂ pela matéria orgânica extraída por 7 horas (adaptado de Aiken <i>et al.</i> , 1985, a partir de Bremner (1950)).....	28
Tabela 3.1 – Composição elementar, razões atômicas, cinzas e humidade das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).....	52
Tabela 3.2 – Razões E4/E6 (absorvência a 465 nm/absorvência a 665 nm) e as absorptividades a 280 nm, ϵ_{280} , das amostras SQ02, SQ25, SNQ02 e SNQ25.....	55
Tabela 3.3 – Bandas de absorção dos espectros de FTIR e respetivas atribuições.....	57
Tabela 3.4 – Distribuição relativa das áreas (% total do espectro) dos espectros de RMN de ¹³ C das amostras SQ02, SQ25, SNQ02 e SNQ25.....	62
Tabela 3.5 – Valores percentuais de aromaticidade e alifaticidade para as amostras de SQ02, SQ25, SNQ02 e SNQ25.....	63

Lista de Abreviaturas

IHSS	Sociedade internacional de substâncias húmicas
HA	Ácidos húmicos
FA	Ácidos fúlvicos
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
ATR	Reflectância total atenuada
RMN	Ressonância magnética nuclear
CPMAS	Polarização cruzada e rotação no ângulo mágico
TGA	Curva termogravimétrica
DrTGA	1ª derivada da curva termogravimétrica
SQ02	Solo queimado 0 a 2 cm
SQ25	Solo queimado 2 a 5 cm
SNQ02	Solo não queimado 0 a 2 cm
SNQ25	Solo não queimado 2 a 5 cm

1. Introdução

1.1 Considerações gerais

As substâncias húmicas são os principais componentes da matéria orgânica natural dos solos e águas. Responsáveis pela cor castanha, característica de detritos de vegetais em decomposição, ou preta, dos solos superficiais (IHSS).

As substâncias húmicas são misturas complexas e heterogêneas de materiais polidispersos formados por reacções químicas e bioquímicas durante a decomposição e transformação de resíduos de vegetais e animais (um processo chamado humificação). A lenhina das plantas e os seus produtos de transformação, como polissacarídeos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, melanina, etc., são importantes componentes que fazem parte deste processo (IHSS).

A estrutura química e as reacções das substâncias húmicas têm sido objecto de estudo há mais de 200 anos. Antigamente pouco se sabia sobre estas substâncias mas os resultados obtidos ao longo dos anos, principalmente na última década, trouxeram novos conhecimentos da sua estrutura e propriedades físico-químicas e apontaram para o uso destes interessantes compostos naturais em muitas aplicações práticas (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

Até à data já foram revelados os princípios básicos da estrutura das substâncias húmicas e os mecanismos mais importantes do processo de humificação. Um grande conjunto de dados sobre as características das substâncias húmicas de diferentes ambientes naturais foi acumulado e foram também estudados os mecanismos da acção fisiológica das substâncias húmicas a nível molecular, membranar e celular (Chukov *et al.*, 2010).

Os cientistas demonstraram o valor ambiental das substâncias húmicas permitindo o equilíbrio em ecossistemas naturais e melhorar as condições de funcionamento de um biosistema em situações de stress. Estas podem ser usadas para preservar o ambiente e recuperar terrenos contaminados com metais pesados, núcleos radioativos, pesticidas e outros xenobióticos (Chukov *et al.*, 2010).

Apesar de todos os avanços feitos nesta área, a estrutura das substâncias húmicas continua desconhecida, sendo hoje o principal objetivo dos cientistas desenvolver um conceito válido da estrutura química das substâncias húmicas. Atualmente, a caracterização

de misturas complexas de ácidos húmicos e fúlvicos é considerada um dos itens mais importantes no estudo científico de substâncias húmicas.

1.2 Objectivo do trabalho

A matéria orgânica é um fator chave para os solos florestais. Tem uma influência direta e/ou indireta em todas as características físicas e químicas do solo. As substâncias húmicas são uma das frações mais importantes da matéria orgânica e são consideradas como um dos componentes mais abundantes da natureza.

Os fogos constituem uma das maiores perturbações do ciclo de nutrientes do ecossistema, e o seu efeito nas propriedades físicas, químicas, bioquímicas e microbiais tem sido estudado ao longo dos anos. Devido às grandes variações na severidade, frequência e características dos fogos, à variedade de ecossistemas afetados e à complexidade dos efeitos dos fogos, esta área de estudo é ampla e em constante progresso.

O estudo dos solos queimados é necessário para estimar a degradação dos solos e aplicar técnicas de reabilitação adequadas. Devido à abundância e importância das substâncias húmicas no solo, estudou-se o impacto dos fogos florestais na fração mais importante das substâncias húmicas dos solos, os ácidos húmicos.

Para isso, recolheram-se amostras em solos florestais, sujeitos a incêndio e não ardidos, em camadas de 0 a 2 cm e de 2 a 5 cm. Depois de extraídos e purificados, os ácidos húmicos foram analisadas por termogravimetria, análise elementar e espectroscopia de UV-Vis, FTIR, RMN e fluorescência.

1.3 Matéria orgânica do solo

A matéria orgânica ocorre vastamente nos solos, águas e sedimentos, e desempenha um papel importante em vários processos naturais e antrópicos, como o ciclo global de carbono e azoto e ainda o transporte de poluentes orgânicos e inorgânicos (Fiorentino *et al.*, 2005)

Os processos responsáveis pela formação e estabilização da matéria orgânica são só parcialmente conhecidos. Os tecidos dos resíduos das plantas e animais são parcialmente decompostos no solo através da atividade microbiológica e enzimática extra celular. A

maior parte da biomassa de resíduos é rapidamente mineralizada e assim reciclada para a atmosfera (primariamente como CO₂) ou libertada para o solo como nutrientes (tais como amoníaco, nitrato, fosfato, sulfato). Contudo, uma fração do resíduo de biomassa é transformada num material estabilizado que tem sido tradicionalmente chamado húmus (Laird *et al.*, 2008).

Segundo Stevenson, húmus e matéria orgânica natural do solo podem ser usados como sinónimos e incluem o total de compostos orgânicos nos solos, excluindo tecidos de animais e plantas não degradados, os seus produtos de “decomposição parcial”, a biomassa do solo (matéria orgânica do solo presente como tecido microbial vivo) e compostos de origem antrópica. Húmus inclui substâncias húmicas e produtos de ressíntese de microrganismos estáveis que fazem parte do solo (Sparks, 2003).

1.3.1 Importância da matéria orgânica do solo

A matéria orgânica, como se poderá ver mais à frente, é constituída maioritariamente por substâncias húmicas, que têm grande influência nas propriedades dos solos. As substâncias húmicas ajudam a desagregar os solos argilosos e compactos, assistem a transferência de micronutrientes do solo para as plantas, melhoram a retenção da água, aumentam a velocidade de germinação das sementes e estimulam o desenvolvimento das populações de microbiana nos solos. Estas também diminuem a velocidade de evaporação da água dos solos, o que é especialmente importante em solos onde a argila está presente em baixa concentração, áreas secas e em solos arenosos sem capacidade de retenção de água. As substâncias húmicas também se ligam a compostos orgânicos antropogénicos, diminuindo ou mesmo eliminando a sua atividade biológica (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

Tabela 1.1 – Propriedades gerais do húmus e efeitos associados no solo (adaptado de Stevenson, 1994).

Propriedade	Observações	Efeito no solo
Cor	A cor escura típica de muitos solos é causada pela matéria orgânica	Pode facilitar o aquecimento
Retenção de água	A matéria orgânica pode manter até 20 vezes o seu peso em água	Ajuda a prevenir a seca
Combinação com minerais de argila	Consolida as partículas do solo em unidades estruturais chamadas agregados	Permite a troca de gases, estabiliza a estrutura, aumenta a permeabilidade
Quelação	Forma complexos estáveis com Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e outros catiões polivalentes	Melhora a disponibilidade dos micronutrientes para plantas superiores
Solubilidade em água	A considerável insolubilidade da matéria orgânica é devida em boa parte à sua associação com a argila ou catiões divalentes e trivalentes	Pouca matéria orgânica é perdida por lixiviação
Ação tampão	Exibe ação tampão para pequenas variações de pH	Ajuda a manter uma reacção uniforme no solo
Troca catiónica	A acidez total de frações isoladas do solo varia entre 300 a 1400 cmoles/kg	O aumento da capacidade de troca catiónica é causado pela matéria orgânica
Mineralização	Decomposição de matéria orgânica origina CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-}	Fonte de nutrientes para o crescimento das plantas
Combinação com xenobióticos	Afeta a bioatividade, persistência e biodegradabilidade dos pesticidas	Modifica a taxa de aplicação dos pesticidas para controlo efetivo

1.4 Substâncias húmicas

Geralmente, a matéria orgânica dos solos, sedimentos e águas naturais pode ser dividida em dois tipos de compostos: material não húmico, por exemplo proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e pequenas moléculas como açúcares e aminoácidos, e substâncias húmicas. As substâncias húmicas são macromoléculas estruturalmente complexas, são ácidas e geralmente heterogêneas e polidispersas. Estas consistem em carbono, oxigénio, hidrogénio e por vezes pequenas quantidades de azoto e ocasionalmente fósforo e enxofre (Zbytniewsk e Buszewski, 2001). Estes dois grupos não são facilmente separados porque algumas substâncias não húmicas, como os hidratos de carbono, podem estar covalentemente ligadas à matéria húmica (Stevenson, 1994).

Tabela 1.2 – Distribuição da matéria orgânica do solo (aproximadamente) em diferentes componentes (adaptado de Stevenson e Cole, 1999).

Tipo de material	Intervalo habitual (% por peso)
Substâncias não húmicas	
Lípidos	1-6%
Hidratos de carbono	5-25%
Proteínas/péptidos/aminoácidos	9-16%
Outras	vestigial
Substâncias húmicas	acima de 80%

As substâncias húmicas são formadas como o resultado da degradação e transformação de resíduos de plantas e animais. A matéria orgânica dos solos pode variar entre 0,1% em solos desertos a 90% em solos orgânicos. As substâncias húmicas constituem aproximadamente 85-90% do carbono orgânico total dos solos mas podem constituir menos consoante o tipo de solo (Zbytniewsk e Buszewski, 2001).

Os péptidos e hidratos de carbono associados às substâncias húmicas podem contribuir 20% ou mais para as composições das substâncias húmicas dos solos. Em contraste, as contribuições destes para as substâncias húmicas aquáticas são aproximadamente na ordem dos 10%. Há várias possibilidades para associações entre estas

moléculas e as substâncias húmicas. As forças de Van der Waals e as ligações de hidrogénio proporcionam processos de fisissorção plausíveis que podem ser quebradas pelo uso de reagentes como ureia, guanidina e dimetil sulfoxido (Hayes e Wilson, 1997).

As substâncias húmicas são resistentes à degradação microbiana devido à sua associação com outras moléculas, à proteção adquirida pela associação a colóides minerais do solo e devido ao aprisionamento nos agregados do solo. Nestas situações, a sua disponibilidade para os microrganismos e para as suas enzimas é impedida. No entanto, estas sofrem alguma degradação ao longo do tempo. Se não fosse assim, a superfície da terra estaria completamente coberta com substâncias húmicas e as águas seriam de uma cor muito escura (Hayes e Wilson, 1997).

Aiken *et al.*, 1985, definiu substâncias húmicas como uma categoria geral de substâncias orgânicas que ocorrem naturalmente, biogénicas, heterogéneas, com cor entre amarelo e preto, elevado peso molecular e refratárias. Esta definição geral ainda é válida mas o uso do termo elevado peso molecular não é tão aplicável hoje como foi até há alguns anos atrás (Hayes e Wilson, 1997), como será explicado posteriormente. As substâncias húmicas, como não pertencem a nenhuma categoria química única, não podem ser definidas em termos estruturais inequivocamente. Nem podem ser definidas em termos funcionais porque não desempenham nenhuma função bioquímica específica. Assim, estas são definidas operacionalmente em termos da sua solubilidade em ácidos e bases aquosas (Hayes *et al.*, 1989).

Ao longo dos anos, vários nomes têm sido atribuídos a muitas das frações de substâncias húmicas. Contudo, 3 frações – ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina – dominam a maior parte da literatura sobre as substâncias húmicas (Hayes *et al.*, 1989).

Ácidos húmicos – Fração de substâncias húmicas que não é solúvel em água em condições ácidas mas torna-se solúvel a maiores valores de pH

O valor de pH 1 é o nível de acidificação usado para separação dos ácidos húmicos dos ácidos fúlvicos (extraídos dos solos), enquanto para os de origem aquática se usa pH 2 (Hayes e Wilson, 1997).

Ácidos fúlvicos – Fração de substâncias húmicas que é solúvel em água em todas as condições de pH.

É a fração que fica em solução depois de se acidificar a solução de substâncias húmicas a pH 1 (Hayes e Wilson, 1997).

Humina – Fração de substâncias húmicas que não é solúvel em água a nenhum valor de pH.

Na base desta definição, a humina pode incluir qualquer tipo de material húmico que é dissolvido em solventes não aquosos depois de o solo ter sido extraído com bases aquosas. É geralmente considerado que a humina esteja associada com colóides inorgânicos do solo. A humina não se dissolve em soluções aquosas devido ao facto das faces polares das moléculas se encontrarem ligadas aos colóides inorgânicos expondo assim as faces hidrofóbicas, que não são solvatadas (Hayes e Wilson, 1997).

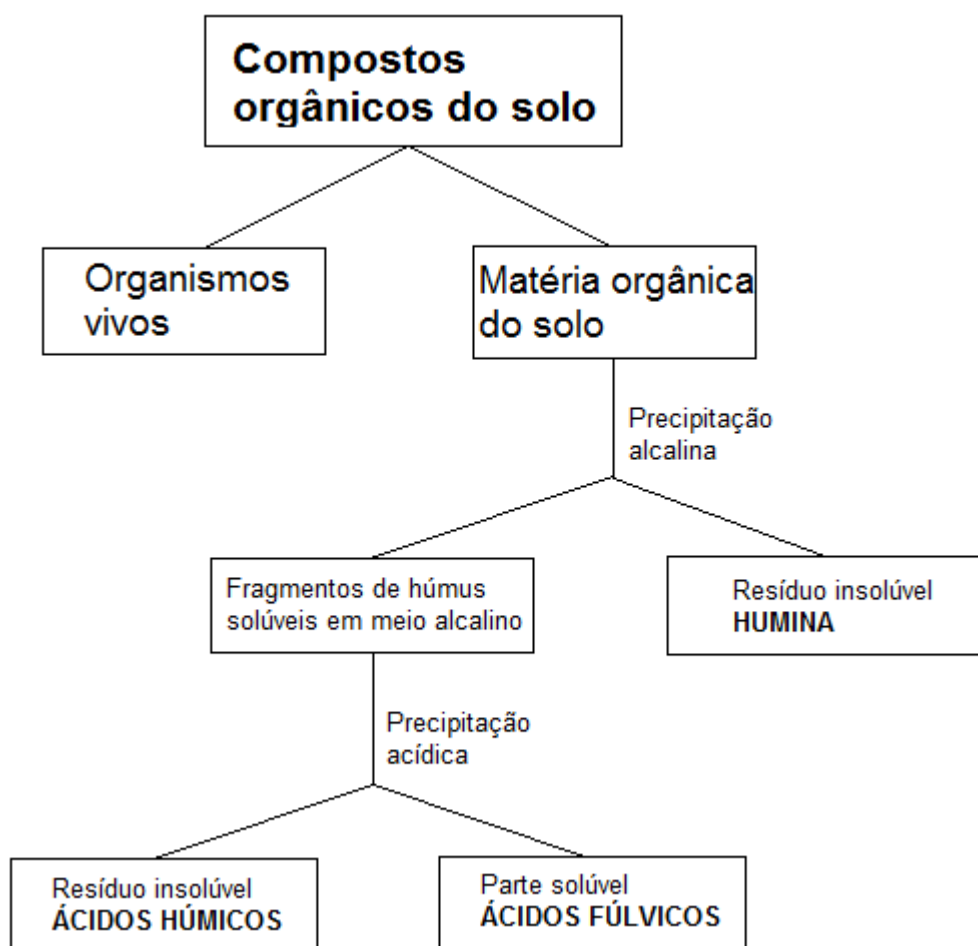


Figura 1.1 – Esquema da divisão das substâncias húmicas de acordo com a sua solubilidade (adaptado de Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

Estas definições têm se mantido ao longo do tempo devido à sua utilidade prática. A solubilidade em água é um critério efetivo devido à sua dependência de características químicas importantes, como o conteúdo em grupos funcionais ácidos, o peso molecular, a aromaticidade, etc. (Aiken *et al.*, 1985).

É importante perceber que estes termos não representam compostos puros, mas, por causa da natureza operacional das definições, cada fração nomeada consiste numa mistura heterogênea e complicada de substâncias orgânicas. Até à data, todas as tentativas de separar substâncias húmicas em compostos puros não foram bem sucedidas. Tem sido possível fracionar parcialmente as substâncias húmicas com base nas características químicas e no tamanho molecular, mas, contudo, até as frações mais homogêneas são heterogêneas (Hayes *et al.*, 1989).

Estas frações aumentam em peso molecular e ficam mais escuras na ordem: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina. Apesar de estas frações serem diferentes, diferindo em ambos peso molecular e conteúdo em grupos funcionais, muitos cientistas acreditam que a humina, os ácidos húmicos, e até certo ponto os ácidos fúlvicos são estruturalmente semelhantes. A fração de humina é a mais fortemente associada com material mineral, muitas vezes formando complexos com colóides inorgânicos, e contêm mais componentes alifáticos que as outras frações. Estes componentes são quimicamente e fisicamente resistentes à biodegradação, o que contribui para a natureza mais resistente do que as outras frações húmicas (Prentice e Webb, 2010).

1.4.1 Formação das substâncias húmicas

A formação das substâncias húmicas é um dos aspetos menos compreendidos e um dos mais intrigantes. Apesar de este tema ser um alvo de estudo de longa data, o mecanismo de formação das substâncias húmicas é ainda desconhecido.

Na literatura são apresentadas várias vias para a formação das substâncias húmicas durante a decomposição dos resíduos das plantas e animais do solo, as principais encontram-se representadas na figura 1.2.

A teoria clássica, popularizada por Waksman, sugere que as substâncias húmicas são formadas a partir de certas modificações da lenhina (via 4). Outra teoria, de acordo com esta, sugere que os ácidos húmicos são derivados das quinonas, que por sua vez são formadas a partir dos polifenóis ou produtos de decomposição da lenhina (vias 2 e 3

respectivamente), sendo a maioria dos investigadores de hoje a favor do mecanismo envolvendo as quinonas. Uma quarta teoria sugere que as substâncias húmicas são em parte ou predominantemente originadas a partir de açúcares (via 1). Apesar da importância dos açúcares na humificação ter sido observada, esta teoria não é tão vastamente aceite como as da biodegradação da lenhina (Koivula e Hanninen, 2001).

A elevada heterogeneidade dos componentes das substâncias húmicas representa um obstáculo às determinações estruturais, caso contrário, poder-se-ia assistir a uma maior compreensão da formação destas substâncias (Koivula e Hanninen, 2001).

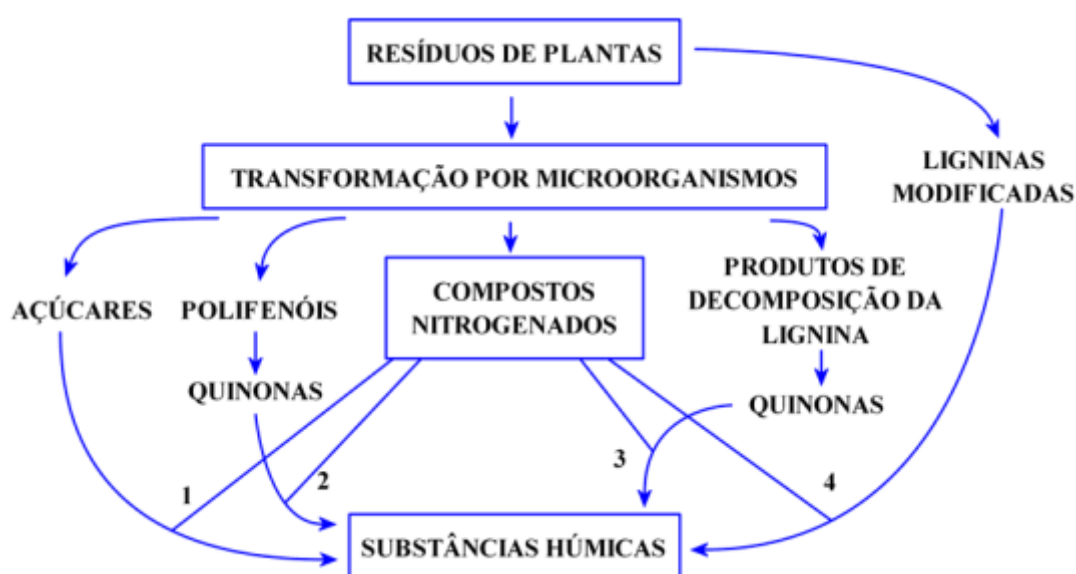


Figura 1.2 – Mecanismos de formação das substâncias húmicas (adaptado de Stevenson, 1994).

Durante muitos anos pensava-se que as substâncias húmicas eram derivadas das lenhinas. De acordo com esta teoria (4), a lenhina não é totalmente utilizada pelos microrganismos e o resíduo torna-se parte do húmus do solo. As modificações da lenhina incluem a perda de alguns grupos metoxilo (OCH_3) com a formação de o-hidroxifenóis e oxidação de cadeias alifáticas formando grupos COOH . Este material modificado é sujeito a outras alterações desconhecidas dando origem primeiro aos ácidos húmicos e depois aos fúlvicos.

Algumas evidências foram citadas por Waksman para suportar a teoria da lenhina na formação das substâncias húmicas: ambos a lenhina e os ácidos húmicos são decompostos com dificuldade considerável pela maioria das bactérias; ambos contêm

grupos OCH_3 , ambos são acídicos, os ácidos húmicos têm propriedades semelhantes a lenhinas oxidadas, etc. (Stevenson, 1994).

Apesar de haver evidência direta para a transformação da lenhina nos solos, é difícil de acreditar, invariavelmente, que os componentes da lenhina refratária são selectivamente preservados. O mais provável é esta preservação estar relacionada com condições ambientais que não são favoráveis a uma atividade microbiana contínua (Koivula e Hanninen, 2001).

Na via 3, a lenhina ainda desempenha um papel importante na síntese das substâncias húmicas, mas de maneira diferente. Neste caso, os aldeídos fenólicos e ácidos libertados da lenhina durante a degradação pelos microrganismos sofrem conversão enzimática para quinonas, que polimerizam formando macromoléculas do tipo húmico (Stevenson, 1994).

A via 2 é semelhante à 3, com exceção da origem dos polifenóis. Na via 2, estes originam-se a partir de fontes de carbono não lenhínicas ou são sintetizados por microrganismos específicos. Na via 3, a fonte de polifenóis é a lenhina. Os aldeídos e ácidos fenólicos, originados a partir da degradação parcial da lenhina, podem sofrer recombinações entre si ou com outras moléculas orgânicas convertendo-se em quinonas (Stevenson, 1994).

Possíveis fontes de polifenóis para a síntese de substâncias húmicas incluem a lenhina, microrganismos, fenóis não combinados em plantas e taninos. Destes, apenas os dois primeiros receberam atenção.

A teoria de formação de substâncias húmicas a partir do açúcar (teoria da condensação amino-açúcar, via 1, remonta ao início do estudo das substâncias húmicas. De acordo com este conceito, os açúcares redutores e aminoácidos, formados como subprodutos do metabolismo microbiano, sofrem polimerização formando polímeros azotados de cor castanha do tipo produzido durante a desidratação de certos alimentos a temperaturas moderadas.

As reacções iniciais, que envolvem a 1,2-enolização dos açúcares e glicosilaminas são aquelas que têm sido postuladas como sendo importantes na formação das substâncias húmicas no solo. Os produtos destas reacções são conhecidos como melanoidinas e a teoria foi inicialmente proposta por Maillard em 1911 (Koivula e Hanninen, 2001).

A maior objeção a esta teoria é o facto de a reação ocorrer muito devagar às temperaturas encontradas em condições normais do solo. Um atrativo desta teoria é o facto dos açúcares e aminoácidos serem produzidos em abundância através da atividade microbiana (Stevenson, 1994).

Com o tempo, foi gradualmente aceite que as substâncias húmicas são formadas por um processo de várias etapas que inclui: (1) a decomposição de todos os componentes das plantas, incluindo a lenhinha, em monómeros mais simples, (2) o metabolismo dos monómeros acompanhado de um aumento na biomassa do solo, (3) reciclagem repetida do carbono da biomassa (e azoto) e (4) polimerização simultânea de monómeros reativos em polímeros de elevado peso molecular. O consenso geral é que os polifenóis sintetizados pelos microrganismos, junto com os libertados da lenhinha, polimerizam sozinhos ou na presença de compostos com azoto (aminoácidos, etc.) formando polímeros de cor castanha. Um mecanismo menos provável é a condensação de aminoácidos e substâncias relacionadas com açúcares redutores, de acordo com a reação de Maillard (Aiken *et al.*, 1985).

Apesar da popularidade da teoria dos polifenóis (via 2), ainda não foi encontrado um mecanismo completamente satisfatório para a ocorrência dos ácidos húmicos e fúlvicos. Na prática, todas as vias são operativas, mas não na mesma ordem de importância nos diferentes ambientes (Stevenson, 1994).

1.4.2 Composição e estrutura das substâncias húmicas

Atualmente, é aceite que as substâncias húmicas consistem numa mistura heterogénea de compostos para os quais nenhuma fórmula química estrutural pode ser dada. Cada fração (ácidos húmicos, fúlvicos, etc.) é constituída por uma série de moléculas de tamanhos diferentes, poucas tendo precisamente a mesma estrutura ou matriz de grupos funcionais reativos (Aiken *et al.*, 1985).

Estas frações diferem em peso molecular, composição elementar, acidez, e capacidade de troca de catiões. Os ácidos fúlvicos são tipicamente compostos por uma variedade de ácidos carboxílicos fenólicos e benzóicos que se mantêm juntos por pontes de hidrogénio, formando estruturas poliméricas. Os ácidos fúlvicos têm baixo peso molecular, maior conteúdo em oxigénio e menor em carbono do que os ácidos húmicos e têm também mais grupos funcionais acídicos, particularmente COOH (Pospíšilová *et al.*, 2008). Outra

diferença importante é que praticamente todo o oxigénio nos ácidos fúlvicos se encontra nos grupos funcionais COOH, OH e C=O; uma grande porção do oxigénio nos ácidos húmicos ocorre como componente estrutural do núcleo (por exemplo ligações éter ou éster) (Aiken *et al.*, 1985). A fração de ácidos húmicos consiste em hidroxifenóis, ácidos hidroxibenzóicos, e outras estruturas aromáticas com ligações a péptidos, compostos amino e ácidos gordos (Pospíšilová *et al.*, 2008).

A natureza polimérica complexa e as interações entre os componentes do material húmico dificultam a análise estrutural. Contudo, alguma informação composicional pode ser obtida a partir de análise elementar e de grupos funcionais (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

A análise elementar típica de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos a partir de uma gama de solos é apresentada na tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Variações típicas da composição elementar para ácidos húmicos e ácidos fúlvicos de solo (adaptado de Killops e Killops, 2005).

Elemento	Ácidos húmicos (wt %)	Ácidos fúlvicos (wt %)
C	53,6-58,7	40,7-50,6
H	3,2-6,2	3,8-7,0
N	0,8-5,5	0,9-3,3
O	32,8-38,3	39,7-49,8
S	0,1-1,5	0,1-3,6

A razão atómica H/C é mais baixa para os ácidos húmicos do que para os ácidos fúlvicos, que é consistente com um maior conteúdo aromático para os ácidos húmicos. A razão atómica O/C é também mais baixa para os ácidos húmicos, refletindo o maior conteúdo de grupos polares nos ácidos fúlvicos. Há diferenças comparáveis entre ácidos húmicos e ácidos fúlvicos marinhos. Apesar dos níveis de azoto e de enxofre serem relativamente baixos nas substâncias húmicas em geral, estes podem ser maiores em ambientes marinhos (Killops e Killops, 2005).

Tabela 1.4 – Abundância estimada dos grupos funcionais (mequiv g⁻¹) nos ácidos húmicos e fúlvicos do solo (adaptado de Killops e Killops, 2005).

Grupo funcional	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos
grupos acídicos totais	5,6-8,9	6,4-14,2
COOH	1,5-5,7	5,2-11,2
OH fenólico	2,1-5,7	0,3-5,7
OH alcoólico	0,2-4,9	2,6-9,5
C=O	0,1-5,6	0,3-3,1
OCH ₃	0,3-0,8	0,3-1,2

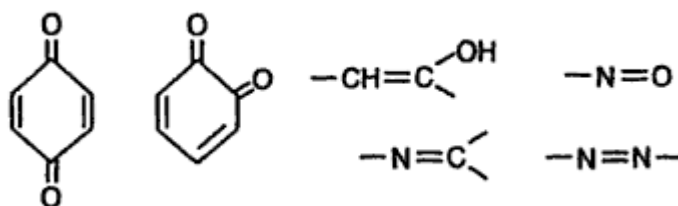
O oxigénio é o maior heteroátomo nas substâncias húmicas e ocorre predominantemente nos seguintes grupos funcionais: COOH, OH, C=O e OCH₃. As abundâncias estimadas destes grupos nos ácidos húmicos e ácidos fúlvicos do solo estão apresentadas na tabela 1.4 em cima.

A maior solubilidade em água dos ácidos fúlvicos quando comparados com os ácidos húmicos pode ser atribuída ao maior conteúdo de grupos polares, particularmente grupos carboxilo. Outros grupos funcionais presentes em quantidades mais pequenas são grupos éter, aldeído e amina (Killops e Killops, 2005).

A estrutura macromolecular dos ácidos húmicos e fúlvicos provavelmente consiste numa cadeia estendida e flexível com ramificações e ligações cruzadas limitadas (Hayes *et al.*, 1989). Ligados a estes estão pequenos compostos, particularmente açúcares e resíduos de aminoácidos que podem ser libertados por hidrólise. As concentrações destes açúcares e aminoácidos são maiores nos ácidos húmicos do que nos fúlvicos e também são maiores nos ácidos húmicos dos solos do que nos ácidos húmicos dos sistemas aquáticos (Killops e Killops, 2005).

A caracterização de misturas complexas de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos é considerada uma das áreas mais importantes no estudo científico das substâncias húmicas. Devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas e tecnologias de informática, grande esforço tem sido feito para elucidar a estrutura molecular dos ácidos húmicos e ácidos fúlvicos (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

O modelo do núcleo da estrutura molecular dos ácidos húmicos provavelmente consiste em micelas de natureza polimérica, sendo a base da estrutura um anel aromático de di ou tri-hidroxifenol ligado por -O-, -CH₂-, -NH-, -N=, -S-, e outros grupos, contendo grupos OH e ligações duplas de quinonas (Stevenson e Cole, 1999). Alguns dos grupos comuns cromóforos que podem ser responsáveis pela cor escura das substâncias húmicas são:



Várias outras estruturas “tipo”, têm sido propostas para os ácidos húmicos e fúlvicos, mas nenhuma delas pode ser considerada completamente satisfatória. Nas figuras 1.3, 1.4 e 1.5 estão apresentadas as estruturas hipotéticas dos ácidos húmicos e ácidos fúlvicos segundo Stevenson (1982), Schulten e Schnitzer (1995) e Buffle (1977) respetivamente.

A estrutura tipo do ácido húmico na figura 1.3 mostra a presença de anéis aromáticos do tipo di e trihidroxibenzeno, assim como a presença do grupo quinona. A estrutura mostra também a presença de azoto como componente estrutural e indica a ocorrência de hidratos de carbono e resíduos de proteínas.

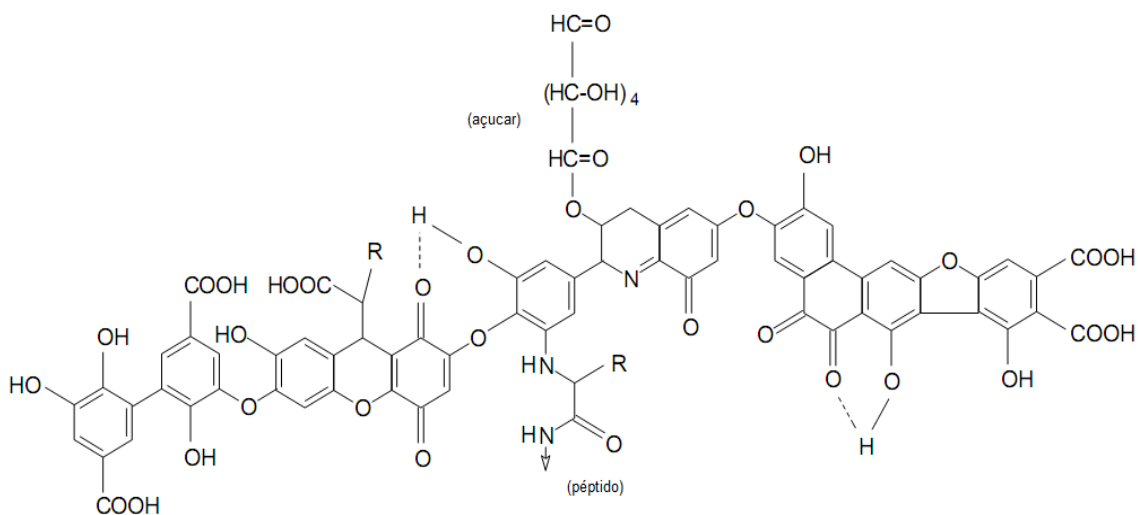


Figura 1.3 – Modelo da estrutura dos ácidos húmicos de acordo com Stevenson (1982).

Outro modelo mais recente, baseado em estudos de pirólise, para a estrutura dos ácidos húmicos foi proposto por Schulten e Schnitzer.

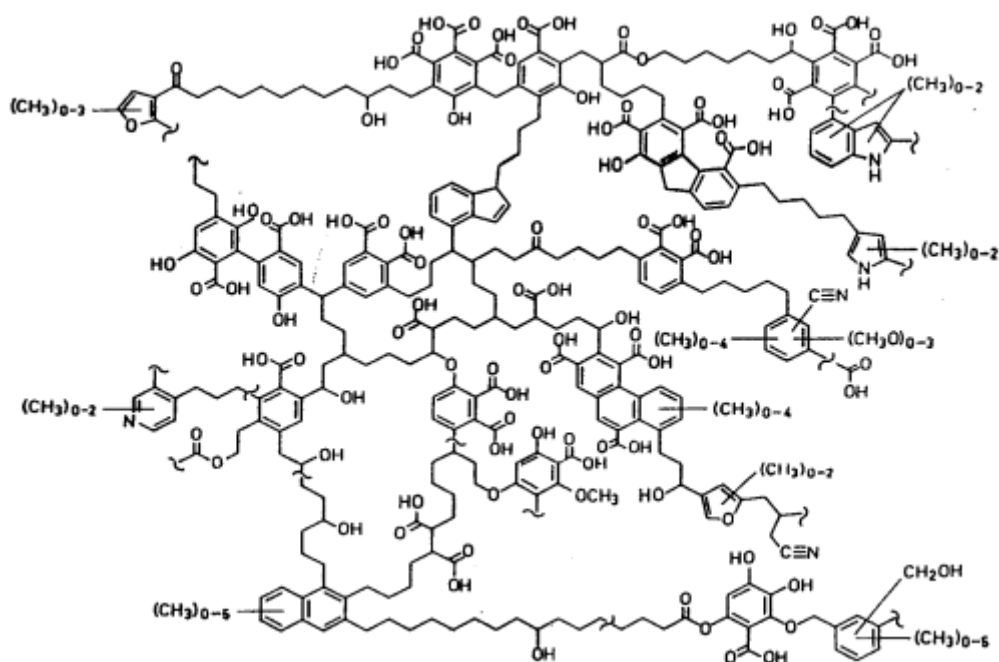


Figura 1.4 – Modelo da estrutura dos ácidos húmicos proposta por Schulten e Schnitzer (1995) (Jones e Bryan, 1998).

Este modelo apresenta vários grupos carboxílicos, fenólicos e alcoólicos, e também a presença de grupos azotados, além de longas cadeias alifáticas que não foram propostas em estudos anteriores. Este modelo para os ácidos húmicos apresenta uma massa molar de 5539,7 g/mol e fórmula elementar C₃₀₈H₃₂₈O₉₀N₅.

A estrutura modelo dos ácidos fúlvicos contém componentes aromáticos e alifáticos extensivamente substituídos com grupos funcionais contendo oxigênio e mostra abundância em grupos COOH.

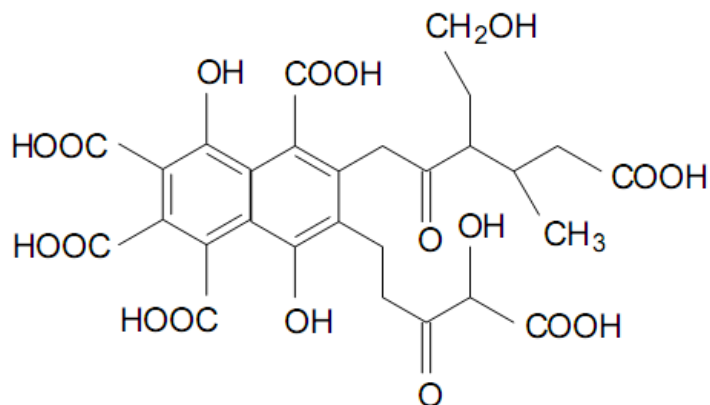


Figura 1.5 – Modelo da estrutura dos ácidos fúlvicos de acordo com Buffle *et al.* (1977).

A humina (material não extraído em meio alcalino) não é representada mas este componente consiste em ácidos húmicos ligados tão fortemente à matéria mineral que os dois não podem ser separados. É constituída por matéria húmica altamente condensada apresentando um elevado conteúdo em carbono (mais de 60%) e assim insolúvel em meio alcalino (Aiken *et al.*, 1985).

Durante muito tempo, foi sugerido, usando diferentes técnicas analíticas, que os ácidos húmicos eram compostos de elevado peso molecular. Contudo, já foi provado que os ácidos húmicos são compostos de baixo peso molecular. Um exemplo disso é o trabalho de Pena-Mendéz *et al.*, 2005, que foi anunciado pela primeira vez num encontro internacional do IHSS (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas) em 1998 (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

O espectro de massa dos ácidos húmicos (figura 1.6) obtido por MS LDI-TOF mostra a presença baixos valores m/z a valores mais elevados. A análise de espectros de massa obtidos para ácidos húmicos diferentes mostra que vários valores m/z são os mesmos para todos os ácidos húmicos, sugerindo que alguns compostos são os mesmos e que estão presentes em ácidos húmicos de origens muito diferentes. Quanto aos ácidos fúlvicos, vários milhares de compostos têm sido identificados, e são principalmente considerados derivados da lenhina (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

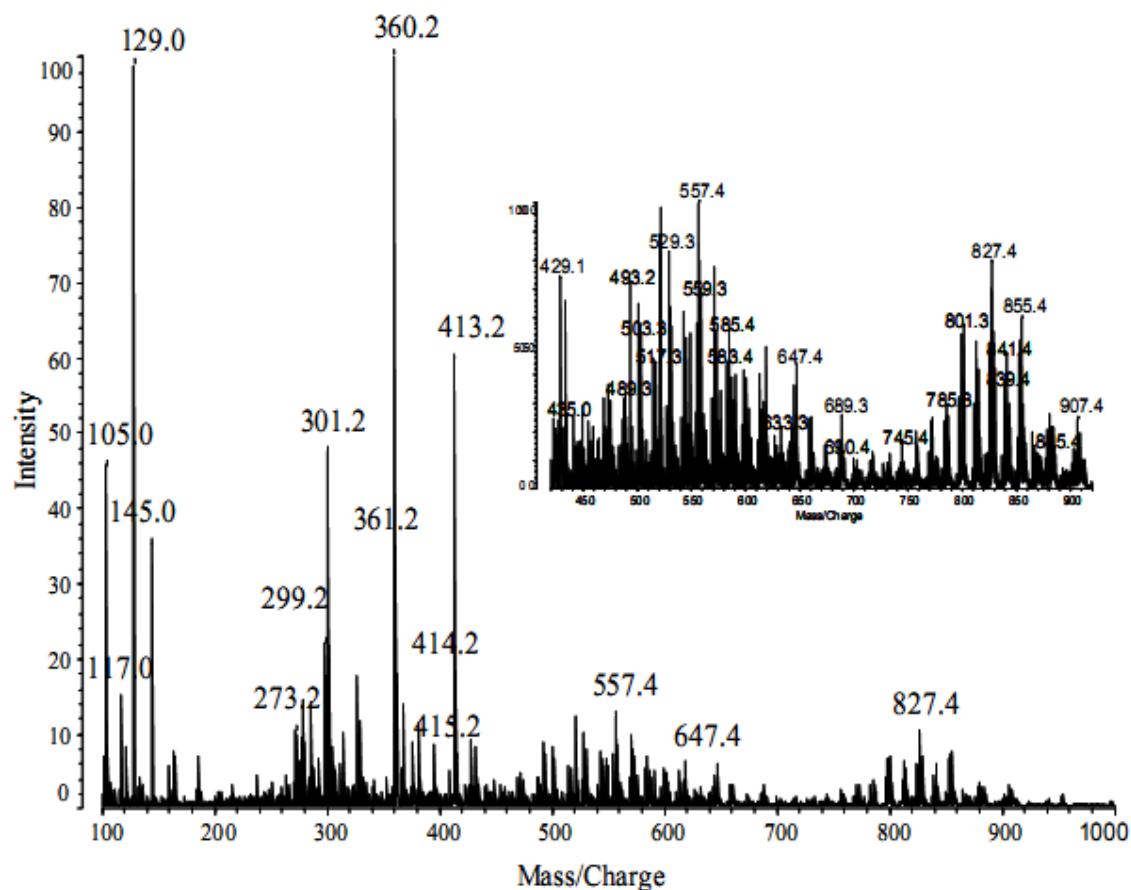


Figura 1.6 – Espectro de massa LDI TOF de ácidos húmicos do solo (Pena-Mendéz *et al.*, 2005).

A microscopia eletrônica de varrimento e medições de viscosidade mostram que a forma e o tamanho das partículas de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos são fortemente afetados pelo pH. A baixo pH, os ácidos húmicos e fúlvicos tendem a agregar, formando fibras alongadas e feixes de fibras. A agregação parece dever-se às ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals e interações entre eletrões π de anéis aromáticos adjacentes assim como a reações homolíticas entre radicais livres. À medida que o pH aumenta, estas forças tornam-se mais fracas, e devido à ionização dos grupos COOH e OH fenólicos, as partículas começam a repelir-se eletrostaticamente, e deste modo os arranjos moleculares tornam-se cada vez mais pequenos mas melhor orientados. Assim, observa-se agregação a baixo pH e dispersão a elevado pH, que é também a base para separar substâncias húmicas em ácidos húmicos e ácidos fúlvicos (Schnitzer e Khan, 1978; Piccolo *et al.*, 1996).

A formação de agregados de ácidos húmicos do tipo micela tem sido observada por uma variedade de métodos incluindo medições de solubilidade e técnicas espectraloscópicas. Num estudo de agregação de ácidos húmicos de turfa predominantemente alifáticos,

Tombácz (1999) sugeriu que cadeias alquila longas contribuíam para um carácter anfifílico dos ácidos húmicos e um comportamento do tipo micelar. Estes agregados são chamados de pseudo-micelas. Estas formam-se a baixas concentrações de ácidos húmicos e são o resultado de agregações intra- e inter-moleculares dos componentes húmicos. Independentemente da existência de uma concentração micelar crítica, o comportamento micelar dos ácidos húmicos em solução indica que estes têm um carácter anfifílico que desempenha um papel dominante neste processo de agregação. Dada a complexidade e polidispersão dos materiais húmicos, é razoável assumir que nem todos os seus componentes têm o mesmo papel no processo de agregação (Chilom *et al.* 2009).

Conte e Piccolo (1999) postularam um arranjo supramolecular para as substâncias húmicas, ou seja, moléculas húmicas pequenas e heterogéneas formariam agregados estabilizados apenas por forças fracas como interações dispersivas e ligações de hidrogénio. Dessa forma, as substâncias húmicas apresentariam uma massa molecular só aparentemente elevada. Observou-se, entretanto, que ao alterar as condições da solução (variações da composição da solução), as forças responsáveis pela interação entre os agregados húmicos poderiam ser quebradas, levando à separação das associações supramoleculares originais que são assim facilmente desfeitas, formando-se posteriormente novas ligações de hidrogénio intermoleculares (Conte e Piccolo, 1999; Cozzolino *et al.*, 2001).

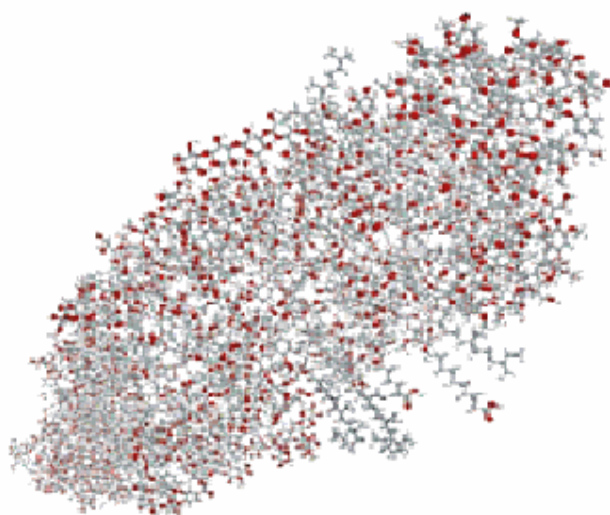


Figura 1.7 – Estrutura hipotética de uma porção da macromolécula de ácidos húmicos. A estrutura foi construída com um software de modelação molecular. Mostra um arranjo tridimensional parcial de energia mínima, que inclui na estrutura partes semelhantes à lenhina (principalmente a parte central do modelo) e alguns componentes como os polissacarídeos e resíduos de proteína (Chesworth, 2008).

A estrutura formada pelas substâncias húmicas permite o aprisionamento de espécies químicas pequenas. Por exemplo, pequenas quantidades de alcanos acíclicos são encontradas na maior parte de amostras de ácidos húmicos e fúlvicos, e alguns ácidos gordos associados às substâncias húmicas podem ser também componentes aprisionados, em vez de ligados diretamente às substâncias húmicas. Estas também contêm usualmente uma variedade de metais que são incorporados na estrutura macromolecular. Os iões metálicos podem se ligar a grupos quelantes adequados, principalmente ácidos carboxílicos das substâncias húmicas que estabilizam os iões, permitindo-lhes serem transportados com o material orgânico (Killops e Killops, 2005).

1.5 Efeito do fogo na matéria orgânica do solo

As florestas têm sido muito influenciadas por incêndios devido a características climáticas durante o Verão, tais como longos períodos secos, temperaturas superiores a 30°C, ventos fortes, tempestades elétricas, e mais recentemente devido à elevada densidade da população humana (Bárcenas-Moreno e Baath, 2009).

Os incêndios têm vários impactos ecológicos e ambientais. A queima da biomassa é uma fonte significativa de gases atmosféricos como o dióxido de carbono e o metano, que são gases que causam efeito de estufa contribuindo assim para o aquecimento global (González-Pérez *et al.*, 2004).

O modelo mais simples para a queima da biomassa assume que os produtos resultantes são água, dióxido de carbono e minerais contidos nas cinzas. Contudo, a oxidação completa da biomassa precisa de condições para a disponibilidade do oxigénio durante o processo de combustão que, em geral, não ocorre na natureza. Em condições ambientais, a combustão é muitas vezes incompleta e monóxido de carbono, metano e uma grande variedade de produtos de pirólise incluindo hidrocarbonetos e frações de matéria orgânica são também produzidas. Assim, os incêndios florestais também produzem uma quantidade considerável de várias formas de carbono em adição à modificação térmica das outras previamente existentes no ecossistema (González-Pérez *et al.*, 2004).

A alteração da matéria orgânica é um dos efeitos mais comuns dos fogos nas propriedades do solo. Esta alteração não é só determinada por fatores relacionados com o fogo, como a intensidade, duração e recorrência, mas também pelas condições locais, como

o tipo de vegetação, a topografia e o clima regional (Satín *et al.*, 2008; Vergnoux *et al.*, 2011).

Devido a esta grande quantidade de fatores, os efeitos dos fogos são muito variáveis. Estudos anteriores têm mostrado resultados conflitantes relativamente à quantidade de matéria orgânica presente depois do fogo (Satín *et al.*, 2008). Estes efeitos podem variar de uma destruição quase total da matéria orgânica do solo a um aumento que pode chegar a 30%. Logo a seguir a um fogo, pode ser observada uma grande diminuição do conteúdo em matéria orgânica em alguns solos devido a mudanças nas propriedades físico-químicas e à remoção temporária da camada herbácea. Contudo, também pode ocorrer um aumento do conteúdo em matéria orgânica devido ao aumento da deposição de folhas secas e de materiais carbonizados de plantas em fogos que afetam a copa das árvores (González-Pérez *et al.*, 2004).

Estudos em ecossistemas naturais, assim como experiências em laboratórios simulando o efeito do fogo em solos naturais ou preparados laboratorialmente, têm mostrado um aumento na aromaticidade. Estas estruturas mais recalcitrantes formadas pelos fogos são derivadas dos hidratos de carbono, lípidos, macromoléculas alquiladas e péptidos. Consequentemente, algumas destas estruturas recentemente formadas, inicialmente não humificadas, podem se tornar extraíveis como a fração húmica (Vergnoux *et al.*, 2011).

Comparativamente com as substâncias húmicas formadas durante o processo de biodegradação-humificação, estes compostos afetados pelo fogo têm algumas diferenças qualitativas na sua estrutura molecular. Enquanto os processos biológicos levam a produtos macromoleculares contendo grupos carboxilo, os tratamentos térmicos removem os grupos com oxigénio exteriores, resultando em materiais com solubilidade comparativamente reduzida e propriedades coloidais. O declínio na concentração de grupos funcionais é esperado mudar as propriedades de sorção e assim a retenção de catiões, nutrientes e poluentes do solo. Isto irá afetar as interações entre a matéria orgânica, argilas e óxidos no solo e assim as propriedades da matriz de todo o solo. Além disso, a desidratação induzida pelo fogo e as reações de ciclização resultam na produção de uma grande quantidade de estruturas condensadas incluindo compostos azotados heterocíclicos (Knicker *et al.*, 2005)

Muitos estudos têm sido feitos sobre a influência dos fogos na estrutura das substâncias húmicas. O trabalho de Vergonoux *et al.* (2011) mostrou, nos ácidos húmicos

depois de um fogo, uma queda significativa de grupos alquilo e hidroxilo, de ácidos carboxílicos e hidratos de carbono. Guinto *et al.* (1999) verificou que em florestas de *Eucalyptus pilularis* o fogo levou à redução de C-alquilo e carbono O-alquilo na matéria orgânica do solo, o que significa uma desnaturação preferencial de hidratos de carbono relativamente a ceras e cutinas. Alcaniz *et al.* (1994) provou que a matéria orgânica do solo de uma floresta de *Quercus ilex* aquecida a mais de 200 °C se tornou mais rica em benzonitrilo, naftaleno e outros hidratos de carbono aromáticos (Certini, 2005).

Numa revisão compreensiva, González-Pérez *et al.* (2004) identificaram os seguintes efeitos principais do fogo na matéria orgânica do solo: (i) remoção geral de grupos com oxigénio externos gerando materiais de solubilidade comparativamente reduzida; (ii) redução do tamanho das cadeias de compostos alquilo, tais como alcanos, ácidos gordos e álcoois; (iii) aromatização de açúcares e lípidos; (iv) formação de compostos azotados heterocíclicos; (v) condensação macromolecular de substâncias húmicas; e (vi) produção de um componente quase inalterável, o “black carbon” (Certini, 2005).

Durante os fogos, só uma pequena parte do calor gerado é transmitido aos primeiros centímetros do solo. A intensidade das alterações produzidas nas características físicas e químicas do solo depende das temperaturas atingidas a diferentes profundidades do solo, do tempo de residência dos picos de temperatura e da estabilidade dos diferentes componentes do solo. De acordo com DeBano *et al.* (1998), o solo seco é um bom isolante, e em consequência, os efeitos do calor estão normalmente limitados aos primeiros centímetros. As variações na matéria orgânica do solo depois do fogo dependem da temperatura atingida e do tempo de aquecimento (Granged *et al.*, 2011).

É muito difícil controlar a intensidade do fogo e o tempo de exposição em condições naturais devido a irregularidades na distribuição da vegetação e condições climáticas. Por esta razão, vários autores têm desenvolvido programas de aquecimento no laboratório de forma a estudar a influência da temperatura nas características físicas e químicas da matéria orgânica (Marcos *et al.*, 2007).

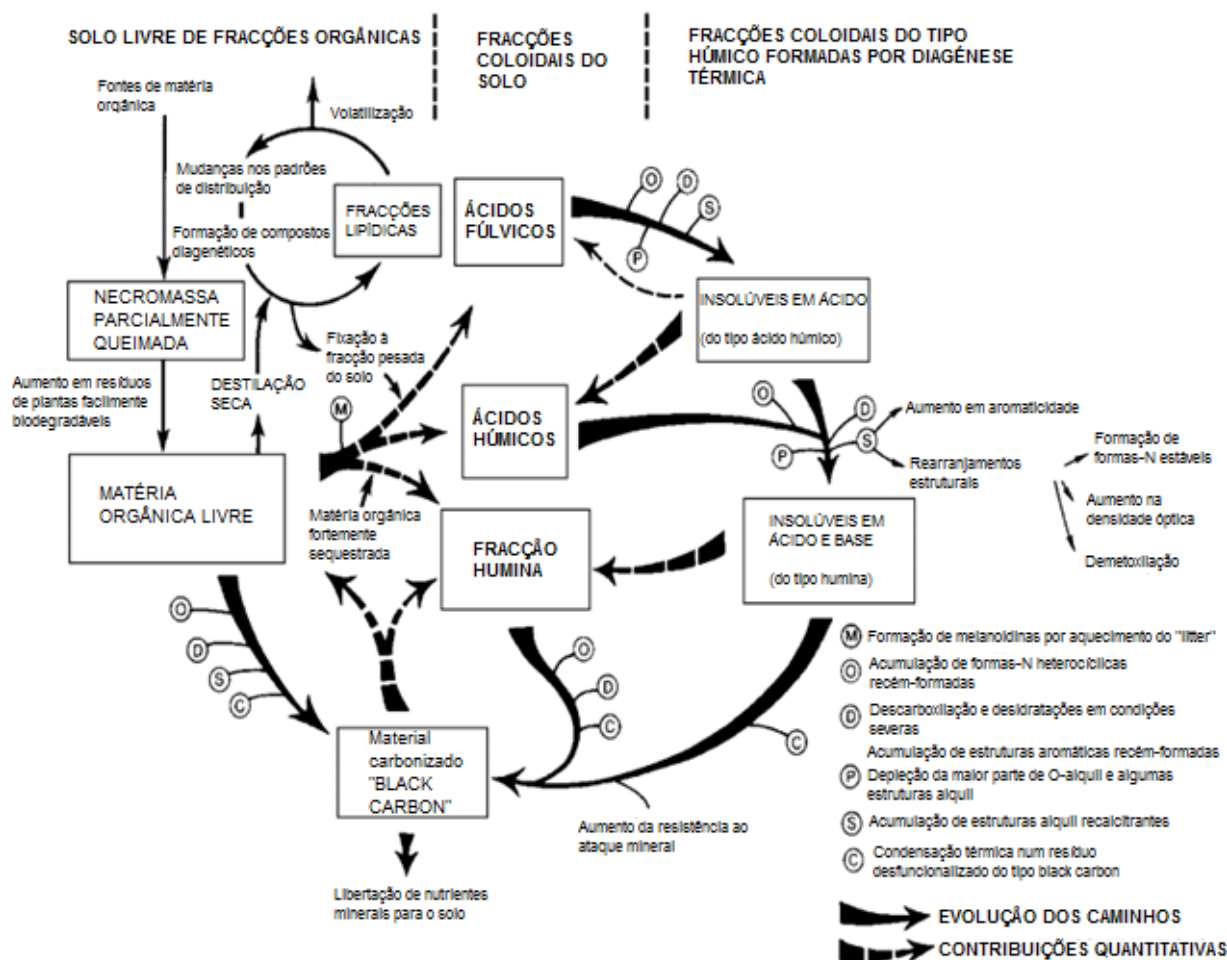


Figura 1.8 – Processos hipotéticos que ocorrem na matéria orgânica de um solo afectado por um fogo severo (González-Pérez *et al.*, 2004).

A exposição da matéria orgânica a temperaturas superiores a 150 °C induz desidratação e formação de núcleos aromáticos, ambos conduzindo a um aumento do conteúdo em carbono e azoto e diminuição do conteúdo em hidrogénio e oxigénio. Acima de 200 °C, a matéria orgânica contém menos estruturas O-alquila, tais como celulose, e mais carbono aromático. Acima de 250 °C observa-se um ligeiro aumento na região carbonilo e um aumento marcado na região aromática. Este enriquecimento em carbono aromático resulta da degradação preferencial O-alquila e neoformação de estruturas aromáticas. Acima de 350 °C formam-se compostos poliaromáticos (Alexis *et al.*, 2010).

A maior parte dos estudos acima foram conduzidos usando aquecimento artificial sob condições laboratoriais. Não é claro se os resultados obtidos durante estudos laboratoriais se aplicam diretamente às transformações da matéria orgânica expostas a fogos naturais. A queima no laboratório geralmente implica o aquecimento de material

fresco a diferentes temperaturas num forno em condições controladas. Como resultado, a disponibilidade do oxigénio, as temperaturas máximas e médias, a duração da exposição e o conteúdo da mistura do ar são altamente estáveis durante as experiências. Em contraste, estes parâmetros são altamente variáveis no espaço e no tempo durante a ocorrência de um fogo natural (Alexis *et al.*, 2010).

Nos estudos laboratoriais, a temperatura é muitas vezes comparativamente baixa e a duração de exposição longa. O uso de temperaturas elevadas é geralmente associado a condições de oxigénio limitadas. Estas condições reduzem ambas a perda de massa e a perda de carbono e aumentam o conteúdo em carbono aromático. Em contraste, espera-se que temperaturas de combustão baixas gerem matéria orgânica pirogénica com baixo conteúdo em carbono e em carbono aromático (Alexis *et al.*, 2010).

Os fogos pouco severos não afetam os solos tão extensamente como os solos severos. Estes podem afetar uma grande variedade de propriedades do solo (como por exemplo a disponibilidade de nutrientes, pH, conteúdo em matéria orgânica, textura, estrutura, etc.). As alterações nas propriedades do solo induzidas pelo fogo podem ter um impacto na produtividade do solo em zonas queimadas, e em alguns casos, de forma irreversível (Granged *et al.*, 2011).

O fogo causa uma redução drástica na biomassa microbiana do solo. De facto, os picos de temperaturas muitas vezes excedem consideravelmente as temperaturas necessárias para matar a maior parte dos organismos vivos. Em casos extremos, o solo pode sofrer esterilização completa. Em geral, as bactérias são mais tolerantes ao calor que os fungos (González-Pérez *et al.*, 2004; Certini, 2005).

Depois de um fogo, há um aumento na disponibilidade dos nutrientes do solo, principalmente na forma de componentes solúveis em água que se tornam disponíveis para os organismos vivos. O efeito “fertilizante” do fogo é conhecido desde o início da agricultura e também afeta as populações microbianas. Parte deste efeito deriva de um aumento do pH do solo, frequentemente observado depois de um fogo, que está associado com um aumento de cationes trocáveis no solo (González-Pérez *et al.*, 2004).

O pH do solo aumenta com o aquecimento como o resultado da desnaturação de ácidos orgânicos. Contudo, mudanças significativas ocorrem só a temperaturas elevadas (>450-500°C), em coincidência da combustão completa e consequente libertação de bases. Khanna *et al.* (1994) verificaram que a capacidade das cinzas para neutralizar a acidez do

solo é bem correlacionada com a soma das concentrações de potássio, cálcio e magnésio nas próprias cinzas (Certini, 2005).

Tabela 1.5 – Sumário dos efeitos dos fogos nas propriedades dos solos florestais (Certini, 2005).

Propriedades físicas, físico-químicas e mineralógicas

Repelência à água: a repelência à água do solo muitas vezes aumenta por causa da formação de camadas contínuas repelentes à água em alguns cm abaixo da superfície. Isto implica limitações na permeabilidade do solo, e assim, um aumento da erosão

Estabilidade da estrutura: a complexidade diminui como resultado da combustão de cimentos orgânicos

Densidade: aumenta devido ao colapso de agregados e ao entupimento dos espaços vazios pelas cinzas e os minerais argilosos dispersos; como consequência a porosidade do solo e a permeabilidade diminuem

Granulometria: não muda diretamente, mas um aumento da erosão pode remover seletivamente a fração fina

pH: em solos não calcários aumenta devido à libertação de cátions alcalinos (Ca, Mg, K, Na) ligados à matéria orgânica

Cor: escurece devido à carbonização e fica mais vermelha devido à formação de óxidos de ferro

Temperatura: muda temporariamente devido ao desaparecimento da manta vegetal e ao escurecimento do solo

Propriedades químicas

Quantidade de matéria orgânica: diminui imediatamente depois do fogo, mas a longo prazo geralmente excede a mesma que antes do fogo

Qualidade da matéria orgânica: muda notavelmente, com um enriquecimento relativo da fração mais recalcitrante ao ataque bioquímico. Isto deve-se ao aquecimento dos resíduos frescos e à neoformação de compostos aromáticos e altamente polimerizados. O material carbonizado, um produto exclusivo de combustão incompleta, mostra tempos de residência de séculos ou até milénios

Disponibilidade dos nutrientes: aumenta notavelmente.

O N orgânico (indisponível, quase sempre coincidente com o azoto total) volatiliza em parte, e outra parte forma amónio, uma forma disponível para os microrganismos. O amónio absorve as cargas negativas das superfícies minerais e orgânicas mas, com o tempo, é destinado a ser bioquimicamente transformado em nitrato, que é lixiviado se não for logo absorvido pelas células. A disponibilidade do N baixa depois para os níveis existentes antes do fogo demorando alguns anos

O P orgânico mineraliza a ortofosfato e a perda por volatilização é negligível; o ortofosfato não é lixiviado do solo prontamente se não for absorvido, precipita como formas minerais ligeiramente disponíveis

Ca, Mg e K geralmente aumentam

Capacidade de troca: aumenta proporcionalmente à perda de matéria orgânica

Saturação base: aumenta como uma consequência da libertação prevalente de bases da combustão da matéria orgânica

Propriedades biológicas

Biomassa microbiana: diminui, a recuperação do nível existente antes do fogo depende da prontidão da recolonização das plantas

Composição da comunidade microbiana: muda como consequência do efeito seletivo do fogo em alguns grupos de microrganismos e a modificação imposta à vegetação; geralmente, os fungos diminuem mais que as bactérias

1.6 Extração de substâncias húmicas do solo

Antes das substâncias húmicas poderem ser efetivamente estudadas, estas têm de ser separadas dos outros constituintes orgânicos e inorgânicos presentes nos solos e águas. Apesar do desenvolvimento e melhorias nos métodos de extração das substâncias húmicas, ao longo de mais de 200 anos, ainda resta muito a ser aprendido.

Segundo Stevenson, o método de extração ideal deve cumprir os seguintes objetivos: o método deve levar ao isolamento de material não alterado; as substâncias húmicas extraídas devem ser livres de contaminantes inorgânicos, como argilas e cátions polivalentes; a extração deve ser completa e o método deve ser universalmente aplicável a todos os solos.

Há um grande número de métodos para a extração de substâncias húmicas nos solos, usando diferentes reagentes de extração, que estão sumarizados na tabela 1.6.

Tabela 1.6 – Reagentes usados para a extração de constituintes orgânicos do solo (Stevenson, 1994)

Tipo de material	Extractor	Matéria orgânica extraída
Substâncias húmicas	NaOH	até 80%
	Extractores suaves	
	Na ₄ P ₂ O ₇ e outros	até 30%
	Quelatos orgânicos	até 30%
	HCOOH	até 55%

Através destes dados, é evidente que a extração de substâncias húmicas do solo com a solução de NaOH é a que leva à maior recuperação de matéria orgânica. Sabe-se que a quantidade de matéria orgânica extraída do solo com uma solução alcalina aumenta com o tempo de extração, mas quanto maior este tempo e mais alcalina for a solução, maiores vão ser as alterações químicas (Andelkovic *et al.*, 2001).

O pirofosfato de sódio (Na₄P₂O₇) também é usado na extração de substâncias húmicas, é um extrator mais leve. O pirofosfato neutro dissolve macromoléculas livres que são ionizadas a pH 7, que são as mais oxidáveis. O pirofosfato também liberta macromoléculas carboxiladas ligadas à parte mineral dos solos pela complexação com catiões polivalentes, especialmente Fe e Al, libertando assim as moléculas orgânicas. O Na₄P₂O₇ e NaOH também são usados como extractores em mistura ou sequencialmente (Gieguzynska *et al.*, 2009).

Os solventes alcalinos permanecem os mais eficientes e os mais utilizados para o isolamento de substâncias húmicas dos solos. De facto, um pH>12 permite a dissociação de todos os grupos funcionais acídicos e dissolve estruturas macromoleculares, livres ou ligadas a minerais do solo (Gieguzynska *et al.*, 2009).

Apesar das soluções alcalinas permitirem a extração de maiores quantidades de substâncias húmicas, estas têm algumas desvantagens associadas ao seu uso: as soluções alcalinas dissolvem sílica da matéria mineral e esta sílica contamina as frações orgânicas separadas do extrato; as soluções alcalinas dissolvem componentes protoplásmicos e estruturais dos tecidos orgânicos frescos e estes misturam-se com a matéria orgânica humificada; em condições alcalinas, ocorre a auto-oxidação de alguns constituintes

orgânicos em contacto com o ar durante a extração e também quando os extratos estão em repouso; e em solução alcalina a condensação entre aminoácidos, aldeídos e quinonas pode ocorrer (Stevenson, 1994).

Um método muito adotado para reduzir os riscos de ocorrência de reações de auto-oxidação consiste em realizar a extração das substâncias húmicas numa atmosfera de azoto. A troca da atmosfera ambiente por uma inerte diminui a possibilidade de reação com o O₂ dissolvido na solução. Geralmente, borbulha-se gás N₂ na solução alcalina durante aproximadamente 15 minutos para reduzir substancialmente a concentração de O₂ dissolvido na solução extratora. Isto faz parte do procedimento sugerido pela IHSS (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas) para a extração de substâncias húmicas do solo (Oliveira, 2009).

Contudo, a utilização de uma atmosfera de N₂ não é suficiente para eliminar os efeitos do O₂, facto que é comprovado pelo estudo de Andelkovic *et al.*, 2001. Estes autores modificaram o procedimento padrão sugerido pela IHSS usando MnSO₄ para a desoxigenação da solução de extração alcalina (ou seja, no caso do procedimento da IHSS, o NaOH). O oxigénio dissolvido presente na solução oxida rapidamente o precipitado de hidróxido de manganês a hidróxido de estado de valência mais elevado, como se mostra na equação seguinte:



Os autores estimaram a interferência do oxigénio na estrutura dos ácidos húmicos comparando amostras extraídas com 3 procedimentos diferentes, o procedimento da IHSS com a adição de MnSO₄, o procedimento padrão da IHSS e o procedimento da IHSS mas sem submeter a amostra a uma atmosfera de N₂, aumentando assim a exposição ao O₂ respetivamente. Através da caracterização por UV-Vis, FTIR e a determinação dos grupos funcionais contendo oxigénio, os autores verificaram que a acidez total e o conteúdo em grupos OH fenólicos são maiores para os ácidos húmicos extraídos pelo método modificado (MnSO₄), o que indica que neste caso os ácidos húmicos possuem menos grupos OH fenólicos (facilmente oxidáveis) alterados. Os autores recomendam este procedimento para obtenção de ácidos húmicos com uma estrutura mais preservada.

Bremner (1950) analisou o consumo de oxigénio em diferentes extrações de substâncias húmicas nos solos e verificou um aumento do oxigénio consumido com a elevação do pH. Os dados da tabela 1.7 mostram que o consumo de oxigénio (oxidação) é

mais pequeno em condições alcalinas mais suaves. Segundo Swift e Posner, a quebra de ligações nas moléculas de ácidos húmicos sob condições alcalinas é extremamente influenciada pela presença de oxigénio (Aiken *et al.*, 1985).

Tabela 1.7 – A influência do pH no consumo de O₂ pela matéria orgânica extraída durante 7 horas (adaptado de Aiken *et al.*, 1985, a partir de Bremner (1950)).

Solvente	Consumo de O ₂ (mm ³ /0,2 g)	
	Solo 1	Solo 2
0,5 M NaOH	896	712
0,5 M Na ₂ CO ₃ , pH 10,5	56	71
0,2 citrato de Na, pH 7,0	39	58
0,1 Na ₄ P ₂ O ₇		
pH 7,0	7	37
pH 8,0	12	-
pH 9,0	31	52

Outro estudo sobre a influência da extração alcalina nas características das substâncias húmicas foi feito por Rosa *et al.*, 2005. Através das curvas de análise termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA), os autores verificaram que a solução alcalina causa modificações na estrutura original da matéria orgânica durante o processo de extração, mesmo utilizando a atmosfera de azoto recomendada pelo IHSS. Isto indica a necessidade de desenvolvimento de métodos ou procedimentos analíticos que permitam estudar as propriedades das substâncias húmicas sem que se necessite de uma etapa de extração.

A figura 1.9 representa um fluxograma do método sugerido pela IHSS para a extração de substâncias húmicas nos solos.

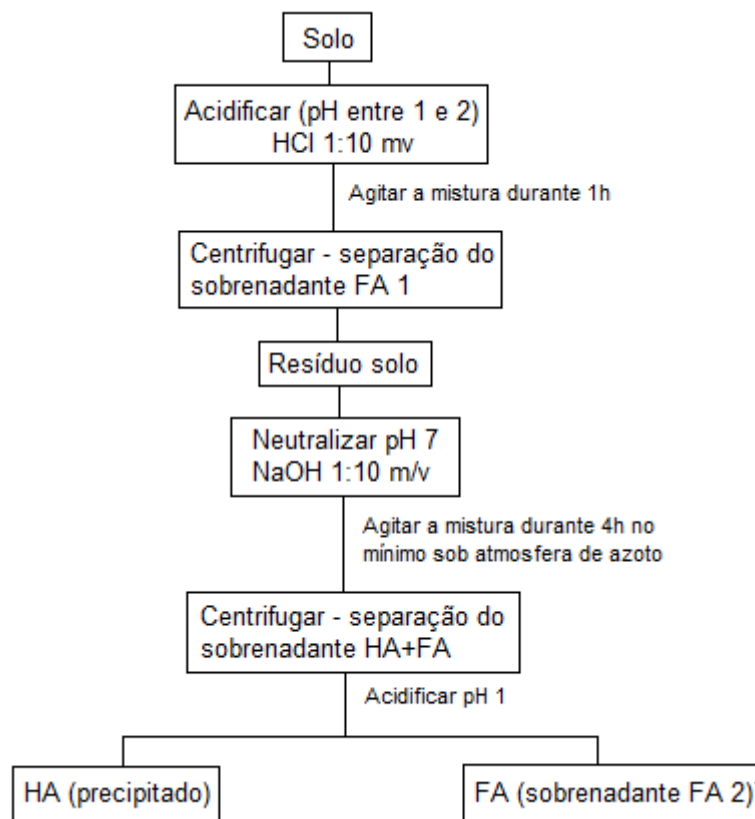


Figura 1.9 – Método de extração sugerido pela IHSS (Oliveira, 2009).

Os procedimentos usados pela IHSS para isolar substâncias húmicas são simplesmente métodos que foram escolhidos por um grupo de cientistas em 1981, com base na informação que estava disponível naquele tempo. Este procedimento não é recomendado como um método padrão, mas é um método que tem sido bastante satisfatório na extração de substâncias húmicas em tipos de solos diferentes podendo ser utilizado em muitos laboratórios (IHSS). Geralmente extrai grandes quantidades de substâncias húmicas e é utilizado como método padrão para permitir a comparação de resultados obtidos em laboratórios diferentes (Oliveira, 2009).

Muitos cientistas têm extraído substâncias húmicas na razão de 10 ml de solução extratora (0,1 M NaOH) para 1 g de solo. No método da IHSS este procedimento também é adotado, como se pode ver pela figura 1.9. Kuwatsuka *et al.*, 1992, do Laboratório de Ciências do Solo da Universidade japonesa de Nagoya, adotaram um procedimento diferente usando a solução de 0,1 M de NaOH para 300 vezes o conteúdo de C no solo (g).

Os autores verificaram que a recuperação da matéria orgânica aumentou com o aumento do volume de extrator, e depois permaneceu constante usando mais do que 300

vezes a quantidade de C no solo para os dois tipos de solo utilizados. Quando os solos contêm grande quantidade de matéria orgânica, a razão de 10 ml de 0,1 M NaOH para 1 g de solo é insuficiente, e o volume de extrator baseado no conteúdo em C do solo é mais adequado do que baseado no peso do solo. Através da análise por UV-Vis os autores verificaram também que devido ao volume insuficiente de extrator no método da IHSS, ácidos húmicos altamente polimerizados e condensados não pareceram ser suficientemente extraídos devido à sua baixa solubilidade na solução alcalina.

As substâncias húmicas geralmente são extraídas de amostras de solo por adição a este de uma solução alcalina extratora depois de se baixar o pH da amostra entre 1 e 2. Este valor baixo de pH é necessário para suprimir a dissociação de grupos funcionais ácidos nas substâncias húmicas, desta forma os grupos ácidos ficarão protonados, não permitindo assim a solubilização dos ácidos húmicos na solução (Janos, 2003).

O aumento da solubilidade da matéria orgânica em presença de uma solução alcalina ocorre devido à repulsão eletrostática entre as cargas negativas presentes nos grupos funcionais ácidos das substâncias húmicas. Estes são dissociados ao valor de pH da solução extratora que está geralmente entre 11 e 13, promovendo assim a sua solvatação (Oliveira, 2009).

Na figura 1.10 encontra-se um esquema para a extração de ácidos húmicos. A adição de KCl, de modo a obter uma concentração de 0,3 M para o K^+ , tem como objetivo coagular as suspensões minerais, de modo a separá-las por centrifugação (Kholodv *et al.*, 2009).

A mistura ácida contendo 0,1 M HCl/0,3 M HF tem como objetivo remover matéria inorgânica associada aos ácidos húmicos e assim obter menores teores de cinzas. Caso necessário, este tratamento deverá ser repetido até se obter um teor em cinzas inferior a 1%. Continuando a etapa de purificação, as amostras de ácidos húmicos são também dialisadas contra água destilada (Oliveira, 2009). Durante a diálise podem ocorrer perdas significativas de constituintes orgânicos de baixo peso molecular (Stevenson, 1994). Clapp e Hayes (1996) verificaram que a filtração das substâncias húmicas com filtros de porosidade entre 0,45 e 0,2 μm foi muito eficaz a baixar o conteúdo de cinzas (Hayes e Wilson, 1997). Este é um procedimento alternativo ao uso da mistura ácida de HCl/HF e a diálise, onde pode haver perda de material húmico.

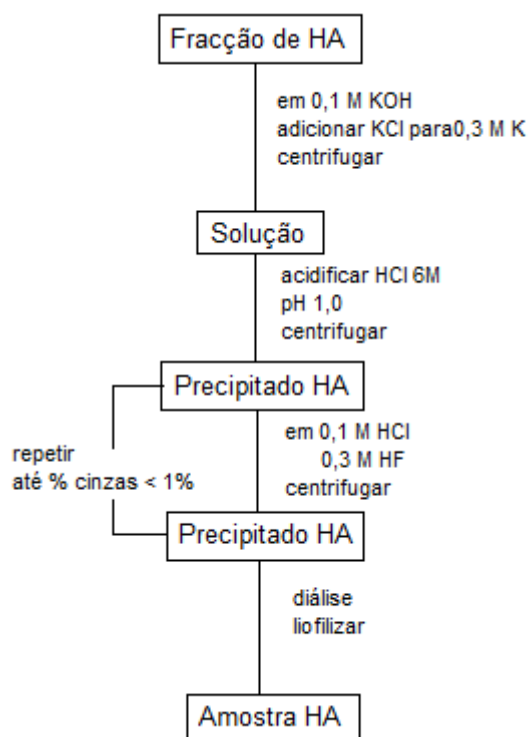


Figura 1.10 – Preparação da amostra de ácidos húmicos pelo método da IHSS.

Na maior parte dos estudos de caracterização da matéria orgânica do solo, a fração de ácidos fúlvicos é rejeitada. A maior razão para este facto é que os componentes da fração de ácidos fúlvicos não são facilmente recuperados do filtrado ácido depois da remoção dos ácidos húmicos. O filtrado, não só contém quantidades apreciáveis de matéria mineral dissolvida durante a extração, mas também sais formados por neutralização da base usada para a extração ($\text{NaOH} + \text{HCl} \rightarrow \text{NaCl}$) (Stevenson, 1994).

Na figura 1.11 encontra-se um esquema para o isolamento de ácidos fúlvicos pelo método da IHSS.

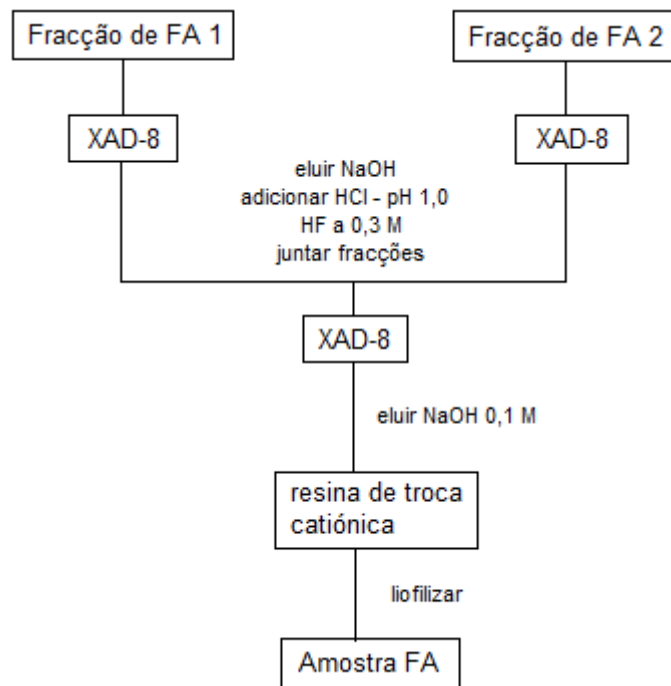


Figura 1.11 - Preparação da amostra de ácidos fúlvicos pelo método da IHSS.

A resina XAD-8 é um polímero de éster acrílico não iónico e macroreticular, com excelentes propriedades de sorção para as substâncias húmicas. Faz-se passar o filtrado ácido depois da remoção dos ácidos húmicos por uma coluna desta resina; os ácidos fúlvicos ligam-se à resina separando-os de sais inorgânicos e outras substâncias orgânicas macromoleculares (por exemplo polissacarídeos), e compostos bioquímicos de baixo peso molecular que não são retidos. O material húmico adsorvido depois é recuperado por eluição com uma base, e os sais são retirados usando uma resina de troca catiónica. O procedimento com XAD-8 permite a obtenção de ácidos fúlvicos com baixo teor de cinzas e livres de substâncias não húmicas (Stevenson, 1994).

Kuwatsuka *et al.*, 1992, além da alteração no procedimento do IHSS mencionada anteriormente, em que o volume da solução extratora se baseia no conteúdo em C do solo e não no seu peso, usaram uma resina de PVP (polivinilpirrolidona) para a extração de ácidos fúlvicos, em alternativa à XAD-8. Através dos resultados obtidos pelo UV-Vis, os autores verificaram que a resina de PVP foi mais eficiente na separação de substâncias húmicas de substâncias não húmicas. A ligação à resina XAD-8 é devida à hidrofobicidade enquanto a ligação à PVP está associada a ligações de hidrogénio a grupos hidroxilo e carboxilo em anéis aromáticos.

Há muitos métodos de extração de substâncias húmicas alternativos ao proposto pela IHSS, como por exemplo a utilização de soluções extratoras diferentes do NaOH. Zaccone *et al.*, 2007, estudaram a influência do extrator na estrutura das substâncias húmicas e no conteúdo de elementos vestigiais selecionados (Br, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn). Composição elementar, FT-IR e fluorescência indicaram que os ácidos húmicos extraídos com NaOH e NaOH+Na₄P₂O₇ são semelhantes, já os extraídos apenas com Na₄P₂O₇ apresentam estrutura diferente dos anteriores.

Todos os resultados analíticos confirmaram que a solução de Na₄P₂O₇ extrai seletivamente compostos orgânicos de elevado peso molecular, ricos em componentes aromáticos e pobres em componentes alifáticos. Em particular, o espectro de FT-IR e razões atômicas indicam que este extrator solubiliza preferencialmente compostos mais aromáticos e adiciona grupos fosfóricos na superfície da molécula de ácido fúlvico.

Os autores também verificaram que os elementos Br, Cu, Ni e Zn são mais concentrados nos ácidos húmicos extraídos com Na₄P₂O₇, provavelmente por causa da maior afinidade destes para o material húmico mais aromático extraído com esta solução. A maior concentração destes elementos nos ácidos húmicos extraídos com Na₄P₂O₇ leva a um maior teor de cinzas quando comparados com os ácidos húmicos extraídos com NaOH e NaOH+Na₄P₂O₇.

O estudo efectuado por Gieguzynska *et al.*, 2009, é semelhante ao anterior, mas além das três formas de extração efetuadas com NaOH e NaOH+Na₄P₂O₇ e apenas Na₄P₂O₇, os autores efetuaram uma extração sequencial, primeiro com Na₄P₂O₇ e depois NaOH. A primeira parte da extração sequencial, com Na₄P₂O₇, originou substâncias húmicas com carácter mais aromático, enquanto a extração seguinte com NaOH originou moléculas de tamanho maior e de carácter alifático. Assim, a extração sequencial com Na₄P₂O₇ e depois NaOH permite a separação de macromoléculas de categorias diferentes.

Como se pode ver, em ambos os estudos, a utilização do Na₄P₂O₇ permitiu a extração de compostos mais aromáticos, mais há uma contradição em relação ao peso molecular dos compostos extraídos com NaOH e Na₄P₂O₇, em que Gieguzynska *et al.*, 2009, obtiveram compostos de maior peso molecular com o NaOH, ao contrário de Zaccone *et al.*, 2007. No estudo efetuado por Piccolo e Mirabella (1987) sobre a distribuição de pesos moleculares de substâncias húmicas extraídas com diferentes soluções orgânicas e inorgânicas, os autores também obtiveram compostos de maiores

pesos moleculares em extrações com NaOH, estando estes resultados de acordo com os de Gieguzynska *et al.*, 2009.

Outra alternativa ao procedimento da IHSS é o método usado por Kholodv *et al.*, 2009, que isolaram ácidos húmicos com extrações sequenciais em meio alcalino pelo menos três vezes. Isto de modo a estudar o efeito do número de extrações na estrutura e propriedades das substâncias húmicas, pois acredita-se que as substâncias húmicas resultantes da primeira extração podem diferir nas suas propriedades e composição daquelas extraídas mais tarde. O número de extrações alcalinas determina a duração do procedimento e afeta o grau de alteração da matéria orgânica do solo durante a extração. Além disso, manter o solo em meio alcalino por muito tempo (mais de três dias) pode resultar na obtenção de substâncias húmicas com diferentes propriedades e estrutura daquelas presentes no solo (Kholodv *et al.*, 2009).

Pelos resultados obtidos, os autores verificaram que a estrutura dos ácidos húmicos isolados por múltiplas extrações mudava regularmente de um passo de extração para o outro. Os ácidos húmicos isolados da primeira extração diferiam significativamente dos isolados pela segunda e terceira extração. Os da segunda e terceira extração são semelhantes em termos de grupos estruturais e pesos moleculares. A extração múltipla alcalina pode favorecer a hidrólise de componentes não húmicos presentes no solo e a sua extração simultânea com os ácidos húmicos.

Globalmente, uma diminuição do conteúdo de carbono (e consequente aumento da razão H/C), um aumento da porção em fragmentos alifáticos e uma diminuição do conteúdo aromático foram observados de uma extração para a seguinte. Foi mostrado, em termos de rendimento, que a maior parte dos ácidos húmicos foram isolados durante a primeira extração, pois o rendimento de ácidos húmicos em cada extração diminuía 3 a 4 vezes quando comparado com o rendimento da extração anterior. Por isso, a maior contribuição para a estrutura dos ácidos húmicos é dada pela primeira extração. Levando isto em consideração, o trabalho adicional causado pelas três extrações e a possibilidade de degradação de componentes orgânicos durante a extração, é recomendado um procedimento com apenas uma extração. Contudo, as extrações múltiplas devem ser usadas em casos específicos, como por exemplo, para o estudo de componentes da humina.

Como pode ser observado, existem diferentes tipos de procedimentos de extração de substâncias húmicas propostos na literatura. Todos apresentam vantagens e

desvantagens e a estrutura das substâncias húmicas varia conforme o método utilizado. Além do método da IHSS e das suas várias variantes, há ainda outras formas de extração de substâncias húmicas que não são aqui referidas, como por exemplo a extracção com ultra-som e microondas (Oliveira, 2009).

1.7 Caracterização de substâncias húmicas

1.7.1 Termogravimetria

A termogravimetria é uma técnica em que o peso de uma amostra é medido em função da temperatura. A amostra é colocada numa termobalança de alta precisão, dentro de um forno, e pesada continuamente durante um programa de aquecimento. A perda de massa associada à reacção térmica é então medida (Plante *et al.*, 2009).

Os instrumentos comerciais modernos para a termogravimetria consistem em: uma balança analítica sensível, um forno, um sistema de gás de purga fornecendo uma atmosfera inerte (ou por vezes reactiva) e um computador para controlo dos instrumentos e aquisição de dados. (Skoog *et al.*, 1998).

Na maioria das vezes em que as técnicas de análises térmicas foram aplicadas ao estudo dos solos, o foco foi nos componentes minerais. Semelhantemente a muitas outras técnicas analíticas usadas no estudo dos solos, é costume separar a fase mineral dos componentes orgânicos antes de se proceder ao seu estudo (Plante *et al.*, 2009).

Recentes estudos têm demonstrado diferenças no padrão térmico de diferentes frações de solo. A estabilidade térmica de qualquer material está relacionada com as suas propriedades químicas e de superfície, a por isso parece óbvio testar se a estabilidade térmica da matéria orgânica do solo pode representar a sua estabilidade biogeoquímica (Plante *et al.*, 2009).

No estudo das substâncias húmicas, a termogravimetria tem sido usada quase exclusivamente para quantificar a mistura e o conteúdo em cinzas. Contudo, alguns autores usaram esta técnica para caracterizar e estudar mudanças na estrutura das substâncias húmicas (Esteves e Duarte, 1999).

Os termogramas, e especialmente as suas primeiras derivadas que realçam mudanças no sinal (variações de peso), fornecem informação importante na estabilidade

térmica das substâncias húmicas. Diferenças nas curvas de decomposição térmica das amostras de substâncias húmicas devem-se provavelmente a diferentes graus de humificação e a diferentes vias biológicas e químicas que podem influenciar a estrutura das substâncias húmicas (Esteves e Duarte, 1999).

A estabilidade térmica da matéria orgânica do solo é essencialmente uma função da composição química, o grau de humificação da matéria orgânica e o grau de associação mineral. A frequência e o tipo de ligações químicas entre os principais constituintes (C, H, O e N) determinam a energia de ligação dentro da molécula. Ligações simples entre C-O, C-N e C-C são relativamente fracas ($350\text{--}412\text{ kJmol}^{-1}$), enquanto ligações insaturadas entre átomos de carbono atingem energias entre $610\text{ e }840\text{ kJmol}^{-1}$. As ligações aromáticas estão situadas aproximadamente a 520 kJmol^{-1} . Consequentemente, a maior energia de ligação entre os átomos de carbono de moléculas aromáticas comparadas a ligações saturadas resulta numa maior estabilidade térmica (Plante *et al.*, 2009).

1.7.2 Análise elementar

A análise elementar de misturas orgânicas complexas (C, H, N, O) é do interesse de muitas áreas tais como química ambiental e alimentar. A análise elementar tradicional geralmente requer alguns miligramas de amostra e aproximadamente 10 minutos de análise para cada amostra. Os métodos térmicos são o tipo mais comum de análise elementar para a análise de C, H e N, em que se decompõe a amostra usando oxidação a temperaturas elevadas seguida de deteção dos produtos formados por condutividade térmica ou por infravermelho não dispersivo. O conteúdo em oxigénio mede-se separadamente usando pirólise e redução da amostra, adicionando reconfiguração instrumental adicional e tempo de análise. Ou então é calculado por diferença percentual relativamente aos outros componentes (Aiken *et al.*, 2007).

A análise elementar é provavelmente a ferramenta mais usada na caracterização de substâncias húmicas. Não permite a determinação de uma forma molecular absoluta mas fornece informação composicional geral e estabelece limites quanto à composição molecular possível (Aiken *et al.*, 1985).

Uma forma de expressar a informação sobre a composição elementar das substâncias húmicas é o uso de razões atômicas. Algumas generalizações relativamente às razões O/C e H/C são (Stevenson, 1994):

- As razões atômicas O/C para os ácidos húmicos do solo são aproximadamente 0,5 e para os ácidos fúlvicos 0,7. A diferença pode refletir maiores quantidades de COOH nos ácidos fúlvicos.
- Para ácidos húmicos do solo, a razão H/C está relacionada com a razão E₄/E₆ (será mencionada posteriormente). Esta é inversamente proporcional à “aromaticidade” ou grau de condensação; razões E₄/E₆ acima de 1,3 correspondem a razões H/C baixas, indicando que muito do material é de natureza alifática.

As razões H/C, O/C e N/C são muito úteis para identificar tipos de substâncias húmicas e controlar mudanças estruturais, para propor novas fórmulas para as substâncias húmicas (Aiken *et al.*, 1985).

1.7.3 Espectroscopia de UV-Visível

A absorção de radiação ultravioleta e visível (UV-Vis) pode ser frequentemente atribuída a um grupo funcional específico de uma molécula, que pode conter eletrões σ , π ou n . Exemplos de grupos cromóforos comuns são grupos funcionais contendo eletrões não ligantes (exemplo: carbonilo, enxofre, azoto, oxigénio e múltiplas ligações carbono-carbono conjugadas) (Aiken *et al.*, 1985).

Um espectro de absorção é o conjunto das absorvências aos vários comprimentos de onda para um composto e varia de substância para substância. Uma vez que diferentes substâncias têm diferentes padrões de absorção, é possível identificar substâncias com base no seu espectro. Contudo, quando o número de pormenores do espectro (como máximos, mínimos e pontos de inflexão) é limitado por vezes a identificação é ambígua. Permite também quantificar substâncias pela lei de Beer-Lambert uma vez que a quantidade de luz absorvida está relacionada com a concentração da substância.

Em muitos casos, a espectroscopia de UV-Vis é uma ferramenta útil para a identificação de grupos funcionais cromóforos em moléculas orgânicas discretas. Mas mesmo uma mistura simples, de dois componentes, pode fazer a interpretação de um espectro de UV-Vis difícil, dificuldade essa que é acrescida quando os solutos de que se

pretende obter a informação são substâncias húmicas, moléculas muito complexas (Schnitzer e Khan, 1978).

Os espectros de UV-Vis de substâncias húmicas são geralmente inexpressivos, com absorvidades aumentando com a diminuição dos comprimentos de onda. Estes espectros variam em função do pH devido à ionização dos grupos carboxílicos e fenólicos. Assim como em outros métodos espectroscópicos, não é conhecida a porção de moléculas que contribui para a absorvência a um dado comprimento de onda (Aiken *et al.*, 1985).

A absorção da luz pelas substâncias húmicas parece aumentar com um aumento do grau de condensação dos anéis aromáticos, com a razão entre o C de grupos aromáticos e o C de cadeias alifáticas, com o conteúdo em C total e com o peso molecular.

Apesar das limitações referidas acima, a espectroscopia de UV-Vis tem outras aplicações úteis. Exemplos destas aplicações estão na estimativa do grau de humificação usando a razão E_4/E_6 (razão da absorvência entre 465nm e 665nm), que é muito utilizada na caracterização destas substâncias. Esta razão é considerada independente da concentração das substâncias húmicas, mas variável com as características estruturais da matéria húmica. A absorvidade específica a 280 nm (ϵ_{280}) tem sido utilizada para avaliar o grau de aromaticidade. Este comprimento de onda é escolhido porque um grande número de compostos aromáticos absorve nesta região do UV (270-280nm) devido a transições eletrónicas $\pi - \pi^*$ (Mendonça *et al.*, 2004; Chin *et al.*, 1994).

Outra aplicação da espectroscopia de UV-Vis é a determinação da concentração de substâncias húmicas dissolvidas através da lei de Beer-Lambert. A espectroscopia de UV-Vis também é utilizada para estudar a interação de iões metálicos com os ácidos fúlvicos – estudos de complexação (Schnitzer e Khan, 1978).

Em conclusão, a espectroscopia de UV-Vis tem valor reduzido para o estudo de substâncias húmicas e não pode ser usada para a determinação direta de grupos funcionais.

1.7.4 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula. Um espectro de infravermelho é obtido passando a radiação de infravermelho através de uma amostra e determinando que fração de radiação incidente é

absorvida a uma determinada energia. A energia a que cada pico do espectro de absorção aparece corresponde à frequência de uma vibração de uma parte da molécula da amostra (Stuart, 1997).

Uma molécula só pode absorver radiação quando a radiação de infravermelho incidente é da mesma frequência que um dos modos fundamentais de vibração dessa molécula. Isto significa que o movimento vibracional da pequena parte da molécula é aumentado, enquanto o resto da molécula não é afectada (Stuart, 1997).

As vibrações podem ser de dois tipos: elongação e deformação. As vibrações de elongação envolvem a alteração dos comprimentos das ligações e podem ser simétricas ou assimétricas; as vibrações de deformação são caracterizadas por uma alteração dos ângulos entre duas ligações.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido muito utilizada em alternativa aos antigos espectrómetros dispersivos. Este método mais recente, o FTIR, é baseado na interferência da radiação entre dois feixes originando um interferograma. Um interferograma é um sinal produzido como uma função da mudança de caminho óptico entre os dois feixes. Os dois domínios da distância e frequência são intercambiáveis pelo método matemático da transformação de Fourier (Stuart, 1997).

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem um grande número de vantagens relativamente às técnicas de infravermelho tradicionais. Estas vantagens incluem melhor resolução, maior razão sinal/ruído e menores tempos de aquisição. O aumento da resolução não é uma grande vantagem no caso das substâncias húmicas devido às bandas largas. Mas a elevada razão sinal/ruído aumenta sensibilidade (Davis *et al.*, 1999).

A técnica da refletância total atenuada (ATR) tem sido a mais utilizada na espectroscopia de infravermelho. Esta consiste na passagem da radiação através de um cristal com um índice de refração elevado, sobre o qual é depositado a amostra. A radiação é refletida uma ou mais vezes nas paredes do cristal e, como parte dela é absorvida pela amostra, a sua intensidade é atenuada. Esta variação da intensidade da radiação é medida e registada em função do comprimento de onda produzindo um espectro de absorção característico da amostra (Stuart, 1997).

Outra forma de obter espectros de FTIR é a partir do método de transmissão usando pastilhas de KBr. O KBr é utilizado porque é inerte e transparente acima de 400 cm^{-1} .

Nesta técnica, o KBr e as partículas da amostra são misturadas juntas com aplicação de pressão. O KBr age como um “solvente” sólido transparente à radiação infravermelho, ajudando a reduzir o produto “percurso óptico” vs “concentração”. A preparação da pastilha de KBr é um processo demorado e requer cuidado. O peso da amostra e as condições de moagem da mistura KBr – amostra, afetam o espectro de infravermelho (Smith, 2011).

A espectroscopia de infravermelho tem sido vastamente usada na investigação de substâncias húmicas e tem permitido um melhor conhecimento da natureza, reatividade e arranjo estrutural. O espectro de IR contém uma variedade de bandas que são indicativas dos diferentes grupos funcionais presentes na mistura. Também tem sido usado para investigar as interações das substâncias húmicas com metais e pesticidas (Barriquello, 2005).

Apesar da espectroscopia de infravermelho também ser uma técnica quantitativa, a aplicação desta na investigação da estrutura e composição de substâncias húmicas tem sido de natureza qualitativa.

Para obter um espectro de infravermelho é necessário menos de 1 mg de amostra. Esta pequena quantidade é uma vantagem quando se compara a espectroscopia de IR com o RMN de ^{13}C de estado sólido, que, tal como a espectroscopia de IR, fornece informação sobre a composição em grupos funcionais, mas necessita de maior quantidade de amostra > 100 mg. A facilidade em obter um espectro de infravermelho, acoplada com a grande quantidade de informação publicada de espectros de infravermelho de substâncias húmicas, faz do FTIR uma técnica atrativa para a investigação da composição das substâncias húmicas (Davis *et al.*, 1999; Aiken *et al.*, 1985).

1.7.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é baseada na medição da absorção de radiação eletromagnética na região de radio-frequência de 4 a 900 MHz. Em contraste com a absorção no ultravioleta, visível e infravermelho, os núcleos dos átomos, em vez dos eletrões externos, estão envolvidos no processo de absorção. Para que o núcleo tenha os estados de energia necessários para ocorrer a absorção, é necessário submeter o analito a um campo magnético intenso (Skoog *et al.*, 1998). A excitação do

núcleo do estado fundamental para um estado de energia mais alto resulta na absorção de radiação a uma frequência própria, originando um espectro que é o registo gráfico da intensidade de absorção em função da frequência (Barriquello, 2005).

A espectroscopia de RMN é uma das ferramentas mais poderosas para elucidar a estrutura de espécies químicas (Skoog *et al.*, 1998).

A espectroscopia de RMN tem sido usada durante décadas para estudar os grupos funcionais da matéria orgânica. Esta técnica é especialmente útil em combinação com os dados da composição elementar, peso molecular aparente e dados do espectro de IV (Matilainen *et al.*, 2011).

A análise quantitativa com RMN de ^{13}C de estado sólido é difícil, mas pode-se fazer análise qualitativa. Apesar de esta técnica oferecer bons resultados relativamente às composições químicas, compostos específicos são raramente identificados. Como a matéria orgânica é quimicamente e estruturalmente heterogénea, a dispersão do desvio químico do espectro de RMN pode ser relativamente grande. A gama dos desvios químicos obtidos é dividida em regiões alifática, alcoxil, insaturada e regiões de carbono carbonilo e carboxilo (Matilainen *et al.*, 2011).

A espectroscopia de RMN de ^{13}C no estado sólido é a técnica correntemente mais utilizada para a caracterização de substâncias húmicas, incluindo frações insolúveis como a humina. Até agora RMN de ^1H tem fornecido pouca informação para o conhecimento estrutura das substâncias húmicas (Colnago *et al.*, 2003).

O passo mais importante para a obtenção de espectros de RMN de ^{13}C de boa qualidade é talvez a preparação da amostra porque espécies paramagnéticas induzem a relaxação rápida do núcleo na proximidade. Apesar das vantagens de RMN, esta nem sempre é uma técnica acessível por causa da sua complexidade e preço (Pospíšilová *et al.*, 2008).

1.7.6 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência é um método em que as moléculas são excitadas por radiação a um certo comprimento de onda e a radiação emitida é medida a um comprimento de onda diferente (Matilainen *et al.*, 2011).

Normalmente a molécula excitada eletronicamente volta ao seu estado excitado mais baixo por uma série de relaxações vibracionais rápidas e conversões internas que não produzem emissão de radiação. Assim, a fluorescência normalmente origina-se a partir de uma transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado eletrónico excitado para o estado fundamental. Para a maior parte dos compostos fluorescentes, a radiação é produzida por uma transição $n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$, dependendo de qual das duas é a menos energética (Barriquello, 2005).

A fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com níveis de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de baixa energia. Compostos contendo estruturas alifáticas, alicíclicas carbonílicas ou estruturas de ligações duplas altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor intensidade quando comparada com a fluorescência exibida pelos sistemas aromáticos (Skoog *et al.*, 1998).

A fluorescência de um composto aromático com substituintes ácidos ou básicos no anel é normalmente dependente do pH. Tanto o comprimento de onda como a intensidade de emissão possivelmente serão diferentes para as formas ionizadas ou não-ionizada do composto. As mudanças na emissão de compostos deste tipo surgem do número diferente de espécies ressonantes associadas às formas ácida e básica das moléculas. Estas observações sugerem que procedimentos analíticos baseados na fluorescência frequentemente requerem controlo do pH (Barriquello, 2005).

O espectro de fluorescência pode ser obtido de 3 modos: emissão, excitação e síncrono. Os espectros de emissão são representações gráficas da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, a um comprimento de onda de excitação constante. Os espectros de excitação são representações gráficas da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de excitação, a um comprimento de onda de emissão constante. Um espectro síncrono é obtido pelo varrimento dos comprimentos de onda de excitação e emissão, simultaneamente, com um intervalo constante entre eles, sendo o comprimento de onda de emissão maior que o comprimento de onda de excitação (Rocha, 2007).

Em conformidade com os princípios de espectroscopia de fluorescência, um aumento no grau de conjugação dos sistemas aromáticos/insaturados das substâncias

húmicas causa uma queda na intensidade de fluorescência e um desvio dos máximos de fluorescência para valores maiores. Isto permite usar a fluorescência como uma medida do grau de humificação. Há um consenso em que a fluorescência dos ácidos húmicos se deve à presença de fenóis e quinóides extensivamente conjugados, enquanto a fluorescência nos ácidos fúlvicos é principalmente causada por compostos aromáticos/fenólicos relativamente simples (Shirshova *et al.*, 2009).

O conhecimento das propriedades de fluorescência das substâncias húmicas tem sido obtido principalmente a partir de espectros síncronos. Para comprimentos de excitação idênticos, os ácidos fúlvicos fluorescem com maiores intensidades e a comprimentos de onda mais curtos do que ácidos húmicos da mesma origem. O espectro de excitação de substâncias húmicas exibe duas bandas largas posicionadas na zona do ultravioleta (a cerca de 250nm) e na zona do visível (a cerca de 340 nm). A localização exata destes picos depende do comprimento de onda de emissão empregado. Como no estudo das substâncias húmicas os diferentes investigadores, muitas vezes, usam diferentes comprimentos de onda de emissão e excitação, a comparação entre estudos distintos é problemática, e por esta razão, uma “impressão digital” da fluorescência das substâncias húmicas ainda não está bem estabelecida (Sierra *et al.*, 2005).

2. Materiais e métodos

2.1 Amostragem do solo

As amostras em estudo foram recolhidas no concelho de Sever do Vouga, na Ermida, distrito de Aveiro. O incêndio, de uma floresta de eucaliptos, ocorreu no dia 26 de Julho de 2010, sendo as amostras recolhidas aproximadamente um mês depois.

As amostras foram recolhidas em encostas queimadas e não queimadas, em transeptos verticais constituídos por 5 pontos equidistantes, designados por A1, A2, A3, A4 e A5, a uma profundidade de 0 a 2 cm e 2 a 5 cm, tal como representado na figura 2.1. Em cada ponto A recolheu-se toda a amostra de solo numa área de 25x25 cm, e para as análises realizadas neste estudo foi preparada uma amostra composta (porções iguais de cada ponto).

A distância entre os vários pontos A foi de 4 m para as amostras queimadas e de 5 m para as amostras não queimadas. A distância entre os locais de recolha nas encostas queimada e não queimada foi de aproximadamente 3 km.

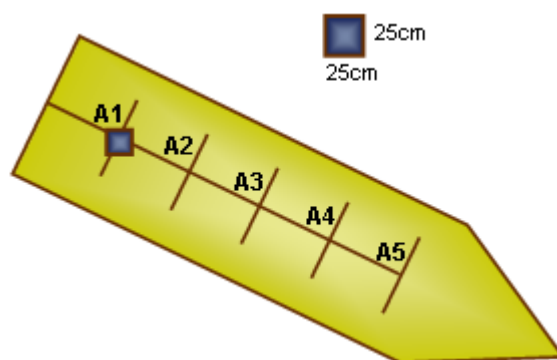


Figura 2.1 – Esquema de recolha das amostras em estudo (Faria, 2008).

Para cada amostragem foram retiradas as cinzas e o *litter* (manta morta). As amostras de solo foram posteriormente secas ao ar e peneiradas utilizando crivos com malhas de 2 mm de diâmetro. A parte da amostra que ficou retida na malha, designada por material grosseiro (fração com mais de 2 mm) foi rejeitada. Todo o material que passou através da malha de 2 mm foi considerado terra fina, tendo sido esta fração selecionada para o objetivo em estudo (Faria, 2009).

2.2 Extração e fraccionamento dos ácidos húmicos

A extração dos ácidos húmicos das amostras em estudo foi realizada de acordo com o procedimento proposto pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Inicialmente ajustou-se o pH das amostras entre 1 e 2 com uma solução de HCl de concentração 1M, adicionando-se de seguida HCl 0,1 M de modo a obter a razão 10 ml líquido: 1 g de amostra. A extração foi feita durante 1 hora sob agitação constante. De seguida centrifugou-se a mistura a 4000 rpm durante 15 minutos aproveitando-se o precipitado, ou seja, a fração de ácidos húmicos (sendo o sobrenadante uma fração dos ácidos fúlvicos). O precipitado foi neutralizado a pH 7 com uma solução de NaOH de concentração 1 M, adicionando-se de seguida NaOH 0,1 M de modo a obter a razão 10 ml de solução: 1 g de amostra. A suspensão foi agitada durante 4h30 min e deixou-se depois repousar durante a noite. Tanto a adição da solução de NaOH como a agitação foram realizadas sob atmosfera de azoto para minimizar a exposição das substâncias húmicas ao oxigénio do ar. A suspensão foi depois centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos para eliminação de argila. O sobrenadante, depois de separado, foi acidificado a pH 1 com uma solução de HCl de concentração 6 M, com agitação constante, e deixou-se repousar durante 16 horas, procedendo-se depois à centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos. A fração dos ácidos húmicos é o precipitado e o sobrenadante é a segunda fracção dos ácidos fúlvicos (que não foram estudados neste trabalho).

2.3 Purificação dos ácidos húmicos

A purificação dos ácidos húmicos iniciou-se com a neutralização do precipitado a pH 7 utilizando uma solução de KOH 1 M. A fração dos ácidos húmicos foi depois redissolvida num volume mínimo de KOH 0,1 M sob atmosfera de azoto. O primeiro passo, a neutralização do precipitado a pH 7, não faz parte do procedimento recomendado pela IHSS, mas foi adotado neste trabalho pois verificou-se que o volume mínimo de KOH 0,1 M que era adicionado não era suficiente para solubilizar os ácidos húmicos. De seguida adicionou-se KCl sólido para obter a concentração de iões K^+ a 0,3 M e centrifugou-se a 7000 rpm durante 20 minutos, em atmosfera de azoto, isto para eliminar sólidos suspensos. Posteriormente, precipitaram-se os ácidos húmicos adicionando HCl 6 M até obter pH 1 (com agitação constante) e deixou-se repousar durante 16 horas. A suspensão foi depois

centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. O precipitado de ácido húmico foi tratado com uma solução 0,1M HCl/0,3M HF na razão HA:HCl-HF=1:10 para remoção de matéria inorgânica, deixando-se a agitar durante a noite e depois procedendo-se à centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos. O precipitado foi aproveitado e o sobrenadante rejeitado. Este procedimento foi repetido até o conteúdo em cinzas ser inferior a 1%. O conteúdo em cinzas foi determinado por termogravimetria. De seguida, procedeu-se à diálise dos ácidos húmicos contra água destilada até a água da diálise dar teste negativo para o Cl^- com AgNO_3 . Por fim, os ácidos húmicos foram liofilizados e armazenados.

Para a diálise utilizaram-se membranas da marca Visking, com 28 mm de diâmetro e porosidade 7000 Daltons.

2.4 Quantificação dos ácidos húmicos

Depois de liofilizados, procedeu-se à pesagem dos ácidos húmicos para a sua quantificação. As percentagens de ácidos húmicos obtidos em cada amostra de solo foram:

- Amostra de solo queimado 0 a 2 cm – 0,24%
- Amostra de solo queimado 2 a 5 cm – 1,75%
- Amostra de solo não queimado 0 a 2 cm – 0,49%
- Amostra de solo não queimado 2 a 5 cm – 0,71%

2.5 Caracterização dos ácidos húmicos

2.5.1 Termogravimetria

As análises foram realizadas num analisador termogravimétrico, modelo TGA-50 (Shimadzu, Japão), com o seguinte programa de aquecimento: 10°C/min até 60°C, mantendo a temperatura durante 120 minutos, aumentado depois 10°C/min até 750°C e depois mantendo também durante 30 minutos. Todas as análises foram conduzidas usando uma cápsula para amostra, de platina, e uma massa inicial de aproximadamente 8 mg. As curvas termogravimétricas (TG), assim como as suas primeiras derivadas (DrTGA) foram obtidas usando o software Shimadzu TAYS.

2.5.2 Análise elementar

As concentrações de carbono, hidrogénio e azoto foram determinadas usando uma técnica de combustão cromatográfica (Analisador Elemental Carlo Erba 1108 da Universidade de Vigo, em Espanha). O conteúdo em oxigénio foi calculado pela diferença: $O\% = 100 - (C + H + N)\%$. Os dados obtidos foram corrigidos para a humidade e para as cinzas. Todas as amostras de ácidos húmicos foram analisadas em triplicado.

2.5.3 Espectroscopia de UV-Visível

Os espectros de UV-Vis foram adquiridos com o espectrofotómetro Shimadzu UV-2101 PC usando células de quartzo de 1 cm. Os dados foram processados com o software incorporado, UV-2101 PC. Os espectros foram registados com uma resolução de largura de banda de 1 nm entre 200 a 700 nm. As soluções de ácidos húmicos para a análise de UV-Vis tinham uma concentração de 15 mg/L e foram ajustadas a pH 8 com NaOH 0,1 M.

2.5.4 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de FTIR foram registados em pastilhas obtidas comprimindo a pressão reduzida uma mistura de 2 mg de ácidos húmicos e 200 mg de KBr usando um espectrofotómetro Mattson 750 equipado com o software Winfirst. Os espectros foram registados no intervalo $4000-280\text{ cm}^{-1}$, com 2 cm^{-1} de resolução, e foram realizados 64 varrimentos para cada espectro.

Pelas suas vantagens, inicialmente a análise de infravermelho tinha sido feita com ATR, mas devido à presença de bandas mal resolvidas nos espectros, optou-se por usar as pastilhas de KBr.

2.5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN-CPMAS ^{13}C (polarização cruzada e rotação no ângulo mágico) foram obtidos usando um espectrómetro Bruker com um campo magnético de 9.4 T. Os espectros foram obtidos a 9 kHz usando polarização cruzada para transferir magnetização dos prótons para os carbonos. O tempo de aquisição foi de 39.990 ms e o

tempo entre dois pulsos consecutivos foi de 5 s. Os desvios químicos são referidos relativamente à escala do tetrametilsilano.

2.5.6 Espectroscopia de fluorescência molecular

Os espectros de fluorescência foram obtidos com um espectrofotômetro Fluoromax-4 equipado com o software FluorEssence, usando células de quartzo 1 cm, em soluções de ácidos húmicos de concentração 15 mg/L com pH ajustado a 8. As fendas de emissão e excitação foram ajustadas a 10 nm. O espectro de emissão foi registado entre 380-550 nm ao comprimento de onda de excitação de 360 nm. O espectro síncrono foi obtido com um λ_{ex} no intervalo 260-400 nm mantendo uma diferença constante de $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 60$ nm. Os espectros foram obtidos subtraindo o espectro da água Milli-Q, gravado nas mesmas condições, para eliminar os picos de dispersão Raman da água.

3. Resultados e discussão

3.1 Termogravimetria

A figura 3.1 mostra a temperatura do forno e a perda de massa de uma das amostras ao longo do tempo. As figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5 mostram as curvas DrTGA (derivada da curva termogravimétrica) para todas as amostras de ácidos húmicos estudadas. Como pode ser observado nas curvas DrTGA, a decomposição térmica procede por 3 fases principais. A primeira ocorre entre a temperatura de 30°C e 150°C e corresponde à evaporação da água incorporada ou absorvida nos ácidos húmicos. A segunda e a terceira fase são mais evidentes e podem ser observadas nos intervalos de temperatura 150-350°C e 350-500°C, sendo esta última a fase onde ocorre maior perda de massa. Depois disso, a perda de massa mantém-se aproximadamente constante, sem mais zonas características observadas, até se atingir a temperatura mais elevada, 750°C (Giovanela *et al.*, 2010).

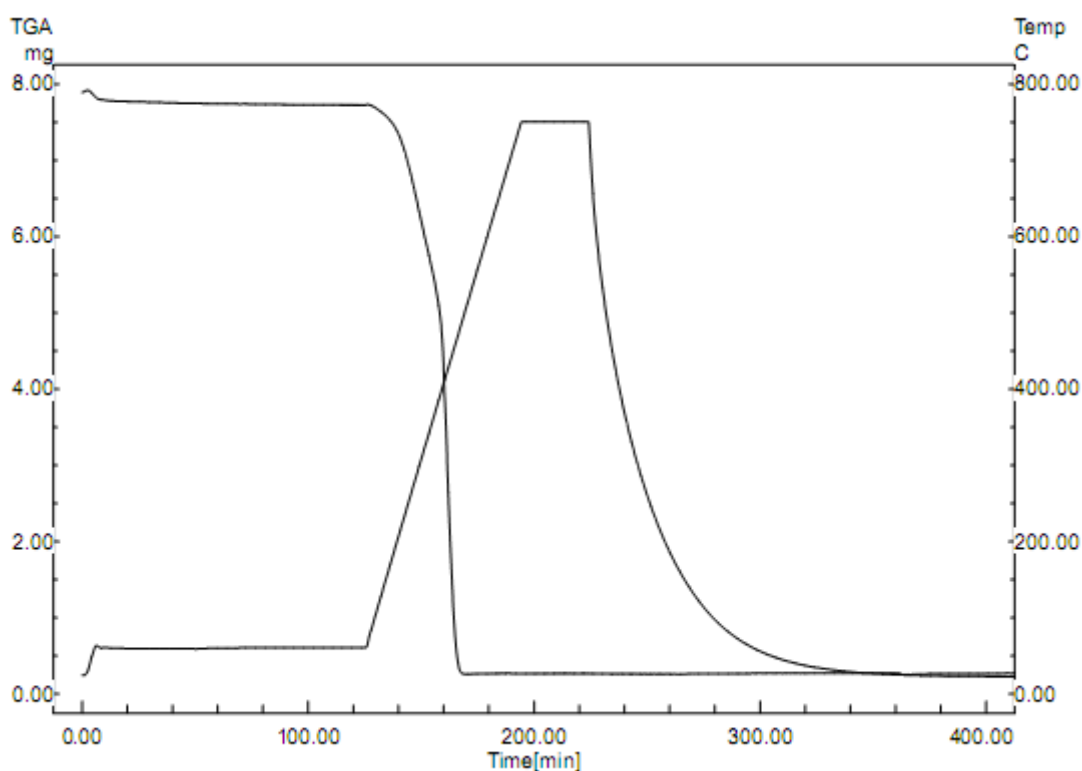


Figura 3.1 – Termograma da amostra de solo não queimado da camada 2 a 5 cm (SNQ25).

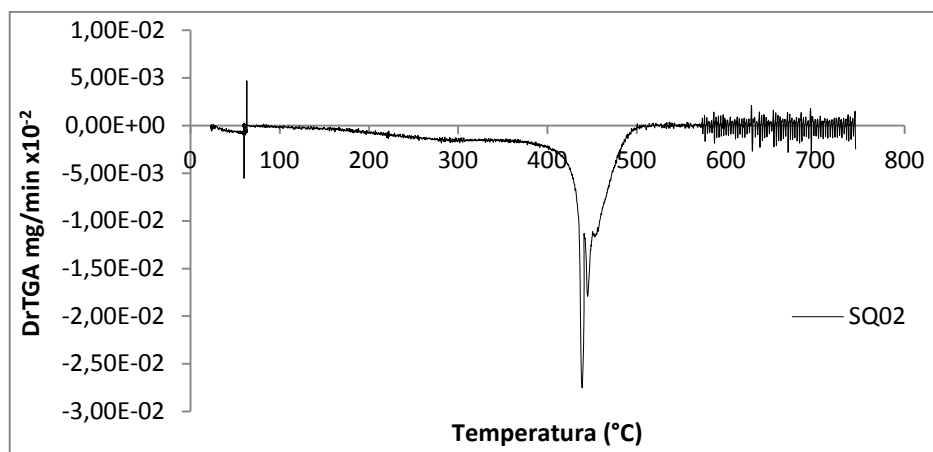


Figura 3.2 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo queimado da camada 0 a 2 cm (SQ02).

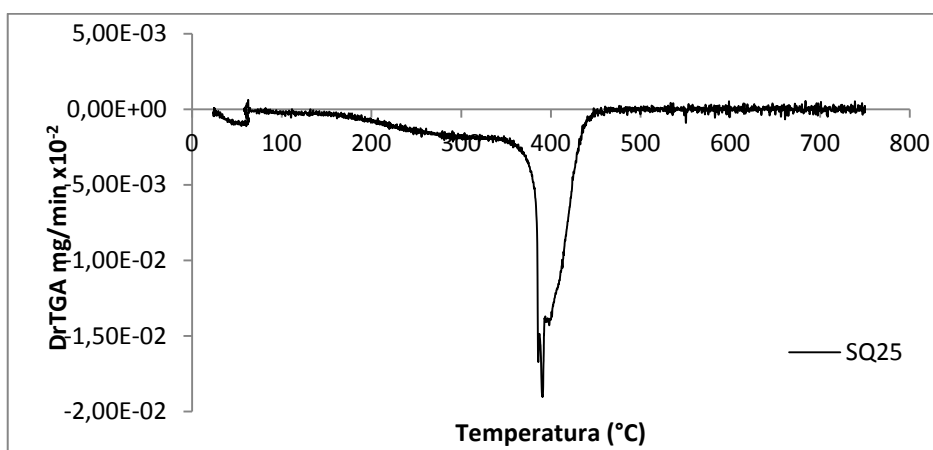


Figura 3.3 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo queimado da camada 2 a 5 cm (SQ25).

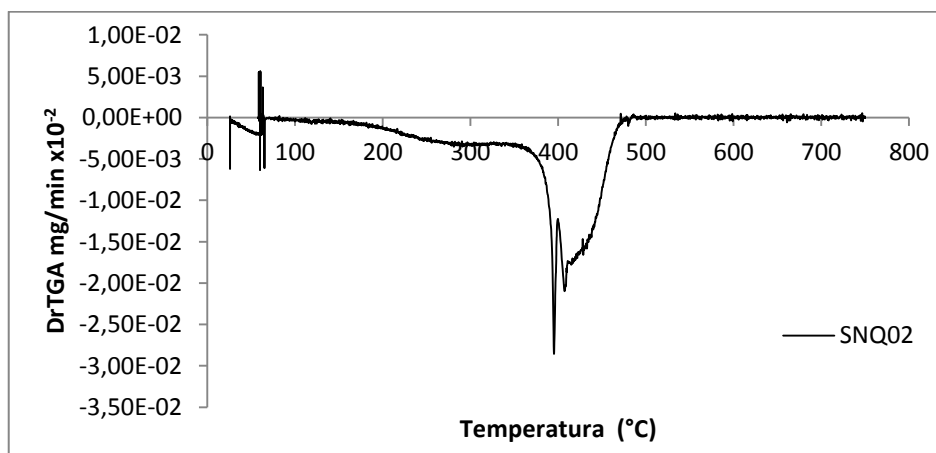


Figura 3.4 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo não queimado da camada 0 a 2 cm (SNQ02).

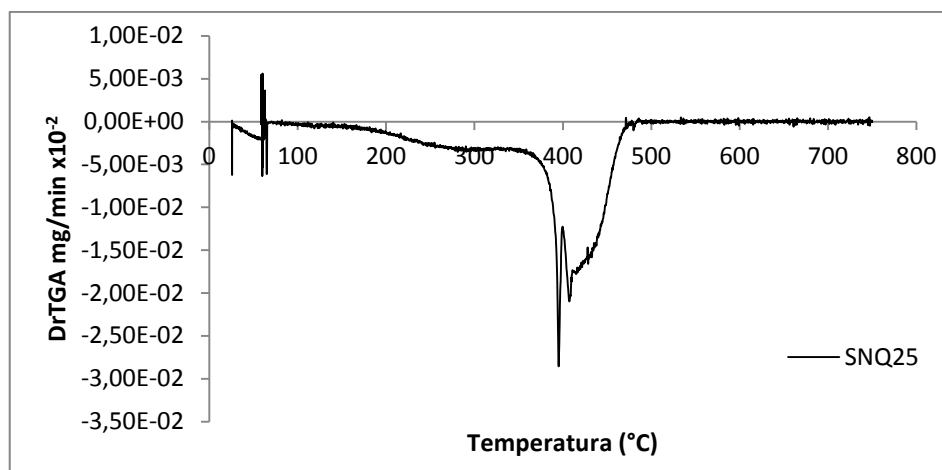


Figura 3.5 – Curva da primeira derivada, DrTGA, da amostra de solo não queimado da camada 2 a 5 cm (SQN25).

O declínio de massa entre 200°C e 400°C observado nas curvas TG para as substâncias húmicas tem sido muito associado à perda de grupos funcionais polares e à combustão de estruturas alifáticas derivadas da decomposição de plantas e animais (Giovanela *et al.*, 2010).

De acordo com o trabalho de Campanella e Tomassetti (1990), a decomposição de grupos carboxílicos, metilo e metileno e perda de insaturação ocorrem entre 260°C e 300°C; ligações C-O de álcoois e polissacarídeos são também destruídas neste intervalo de temperaturas. Ioselis *et al.* (1985) também verificaram a decomposição de grupos carboxílicos, fenólicos, carbonilo e alcoólicos nas substâncias húmicas a cerca de 300°C (Esteves e Duarte, 1999).

Comparando os termogramas obtidos, verifica-se que as amostras de ácidos húmicos de solo não queimado apresentam termogramas muito semelhantes, ambas com dois picos de degradação a aproximadamente 395°C e 406°C, ocorrendo a maior perda de massa a 395°C. Já as amostras de solo queimado apresentam termogramas diferentes, como seria de esperar pois não foram influenciadas pelo fogo da mesma maneira. Ambas apresentam três picos de degradação, em que o último é muito pouco acentuado e nas amostras de solo não queimado corresponde mais a uma banda, mas estes picos são encontrados a temperaturas diferentes. Na amostra de ácidos húmicos de solos queimados da camada 2 a 5 cm (SQ25) estes picos apresentam-se nas temperaturas 385°C, 390°C e 395°C (ocorrendo a maior perda de massa a 390°C), enquanto na amostra de ácidos húmicos de solos queimados da camada 0 a 2 cm (SQ02) estes encontram-se a 438°C,

440°C e 449°C, com maior perda a 438°C. Verifica-se então que os ácidos húmicos da amostra SQ02 são termicamente mais resistentes, sugerindo maior aromaticidade, dado que a componente mais alifática poderá ter sido degradada permanecendo a componente mais aromática. Conclui-se também que a amostra de ácidos húmicos de solo queimado da camada 2 a 5 cm (SQ25) não foi muita afetada pelo fogo pois a decomposição ocorre a temperaturas semelhantes à das amostras de solo não queimado.

3.2 Análise elementar

A tabela 3.1 mostra os resultados da análise elementar das amostras SQ02, SQ25, SNQ02 (ácidos húmicos de solo não queimado da camada 0 a 2 cm) e SNQ25 (ácidos húmicos de solo não queimado da camada 2 a 5 cm). Como se pode observar os valores são relativamente semelhantes, e a única característica observável à primeira vista é a menor percentagem de H na amostra SQ02.

Tabela 3.1 – Composição elementar, razões atômicas, conteúdo em cinzas e humidade das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25). Os resultados obtidos foram corrigidos em relação ao conteúdo em cinzas e à humidade, determinados por análise termogravimétrica. Os valores de oxigénio foram determinados por diferença: $O\% = 100 - (C + H + N)\%$

Amostra	Massa (%)				Razão atômica			Cinzas (%)	Humidade (%)
	N	C	H	O	C/N	H/C	O/C		
SQ02	3,51 ±0,02	61,64 ±0,25	3,98 ±0,09	33,10 ±0,34	20,48 ±0,14	0,77 ±0,02	0,40 ±0,01	2,06	5,71
SQ25	2,93 ±0,03	61,33 ±0,28	4,77 ±0,08	33,97 ±0,26	24,42 ±0,27	0,92 ±0,02	0,42 ±0,01	2,73	6,20
SNQ02	3,35 ±0,02	62,94 ±0,20	5,02 ±0,02	30,71 ±0,20	21,92 ±0,15	0,95 ±0,01	0,37 ±0,01	1,84	7,53
SNQ25	3,18 ±0,02	60,51 ±0,13	5,50 ±0,03	34,34 ±0,16	22,20 ±0,15	1,08 ±0,01	0,43 ±0,01	3,33	2,44

As razões atômicas de H/C, O/C e C/N são usadas para identificar substâncias húmicas de fontes diferentes, para observar mudanças estruturas das substâncias húmicas em ambientes diferentes e para elucidar a sua fórmula estrutural. Para investigar as características dos ácidos húmicos estudados, estas razões foram calculadas com os resultados da análise elementar, e encontram-se também na tabela 3.1.

A razão H/C é um indicador importante do grau de condensação aromática e maturidade das substâncias húmicas, e também do grau de transformação diagenética (Tinoco *et al.*, 2006). O menor valor desta razão para a amostra SQ02 está de acordo com a ideia de que o fogo causa incremento da aromatização, condensação e descarboxilação da matéria orgânica. De facto, já se tinha comprovado com a análise termogravimétrica que a amostra SQ02 é a mais resistente à decomposição térmica, sugerindo maior aromaticidade.

A razão O/C é representativa do grau de oxidação dos ácidos húmicos, sendo influenciada pelas quantidades de grupos contendo hidroxilo, carboxilo e carbonilo, assim como ésteres e éteres. Uma diminuição na razão O/C é geralmente associada a um elevado grau de maturação nos ácidos húmicos, principalmente quando acompanhada por um aumento em aromaticidade (Tinoco *et al.*, 2006). Quanto a esta razão, não é possível tirar nenhuma conclusão devido à falta de um padrão quando analisados os resultados. Mas o esperado seria uma menor razão O/C para a amostra SQ02, pois o fogo deveria levar à perda de grupos funcionais contendo oxigénio. E a partir do RMN também se verificou uma perda de *O*-alquilo nesta amostra, embora se tenha notado um aumento nos grupos carboxilo e carbonilo, o que pode explicar o resultado obtido para a razão O/C.

A razão C/N é um indicador das fontes de substâncias húmicas nos sistemas naturais. Estas variaram entre 20,48 e 24,42, sendo relativamente elevadas, o que indica que as plantas foram os principais contribuintes para estes ácidos húmicos (Xiaoli *et al.*, 2007). Esta razão é menor para a amostra SQ02, sugerindo uma diferente volatilização do C e do N, assim como mudanças nas características da matéria orgânica (Fernandez *et al.*, 2001). Fernandez *et al.*, 2001, também verificaram uma diminuição desta razão com o aumento da temperatura. Com a espectroscopia de RMN também se verificou menores quantidades de *N*-alquilo para a amostra SQ02.

3.3 Espectroscopia de UV-Visível

Os espectros de UV-Vis dos ácidos húmicos isolados neste trabalho encontram-se na figura 3.6. Estes são inexpressivos, com a absorvência a decrescer com o aumento do comprimento de onda. Este tipo de comportamento é típico das substâncias húmicas (Mendonça *et al.*, 2004).

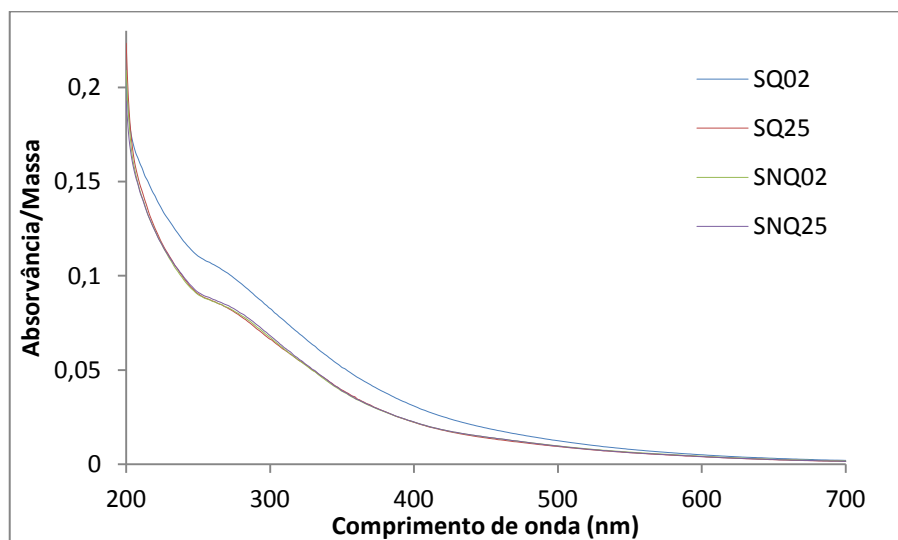


Figura 3.6 – Espectros de UV-Vis (divididos pelas respectivas massas, mg) das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).

Em todos os espectros pode ser observado um ombro a cerca de 270-280 nm. Esta transição eletrônica deve-se à sobreposição da absorção de um grande número de cromóforos presentes no núcleo húmico. Em geral, os cromóforos responsáveis pela absorção na região do ultra violeta são principalmente arenos fenólicos, ácidos benzóicos, derivados de anilina, polienos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com dois ou mais anéis (Giovanela *et al.*, 2010).

A absorvência na região do visível, por outro lado, já é mais difícil de explicar, apesar de alguns autores terem sugerido que podia estar principalmente relacionada com a conjugação estendida em estruturas aromáticas ou poliaromáticas, estruturas quinoidais e sistemas ceto-enol, assim como a presença de complexos metálicos e/ou complexos dador-aceitar inter ou intramoleculares (Giovanela *et al.*, 2010).

Segundo Chen, a razão E4/E6 (absorvência a 465 nm/absorvência a 665 nm) é inversamente proporcional ao tamanho, peso molecular, aromaticidade e ao grau de associação entre as moléculas das substâncias húmicas. Comparando as razões E4/E6 (tabela 3.2) das amostras, verifica-se que esta razão é maior para a amostra de solo queimado de profundidade 0 a 2 cm. Contudo, Tinoco *et al.*, 2006, observaram valores de E4/E6 mais baixos para os solos queimados, isto porque o fogo leva à condensação das moléculas, reflectindo-se em razões E4/E6 mais baixas (Tinoco *et al.*, 2006).

Tabela 3.2 – Razões E4/E6 (absorvência a 465 nm/absorvência a 665 nm) e as absorptividades a 280 nm, ϵ_{280} , das amostras SQ02, SQ25, SNQ02 e SNQ25.

Amostra	E4/E6	ϵ_{280} (LmgC ⁻¹ cm ⁻¹)
SQ02	6,06	0,032
SQ25	5,74	0,026
SNQ02	5,63	0,026
SNQ25	5,88	0,027

A absorptividade a 280 nm, ϵ_{280} , é um parâmetro usado para comparar a aromaticidade das amostras (Richard *et al.*, 2011). Baixos valores de ϵ_{280} podem ser indicativos de maior conteúdo em hidratos de carbono, pois estes compostos têm baixa absorvência a este comprimento de onda. Valores mais altos indicam maior aromaticidade (Mendonça *et al.*, 2004). Os valores ϵ_{280} das amostras são muito semelhantes com exceção da amostra SQ02. Tendo isto em conta pode concluir-se que o fogo afetou apenas a camada superior levando a um aumento da aromaticidade na estrutura dos ácidos húmicos.

3.4 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho obtidos para as amostras em estudo encontram-se representados na figura 3.7. As principais bandas de absorção e as respetivas atribuições encontram-se sumarizadas na tabela 3.3. Como pode ser observado, os espectros apresentam características típicas de substâncias húmicas e são muito semelhantes.

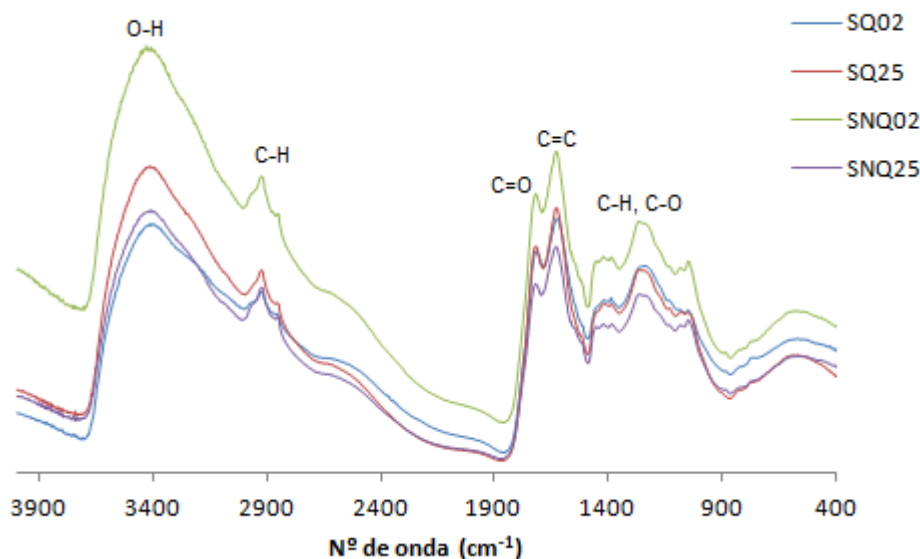


Figura 3.7 – Espectros de FTIR das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).

A banda a cerca de $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ é a mais larga para todas as amostras. Esta banda, nas substâncias húmicas, tem sido atribuída à elongação de grupos OH, e secundariamente, à elongação N-H de vários grupos funcionais. Contudo, em geral N é um componente minoritário nas substâncias húmicas quando comparado com a concentração dos grupos funcionais que contêm oxigénio (Vergnoux *et al.*, 2011).

O grau de saturação das substâncias húmicas pode ser inferido observando a zona de absorção a cerca de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$. Para todas as amostras, duas bandas aparecem nesta região (aproximadamente a 2925 e 2855 cm^{-1}). Estas bandas são atribuídas à elongação C-H assimétrica e simétrica respetivamente, de grupos metilo e metileno em cadeias alifáticas.

Na região $1720\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, aparecem também mais duas bandas. Uma aproximadamente a 1718 cm^{-1} , que corresponde à elongação C=O de grupos carboxilo e carbonilo, e é, em geral, menos pronunciada que a segunda, localizada a aproximadamente a 1626 cm^{-1} . Esta última banda de absorção tem várias atribuições incluindo a elongação C=C aromática, elongação C=O de grupos amida (amida I) e quinonas, e deformação N-H.

Tabela 3.3 – Bandas de absorção dos espectros de FTIR e respectivas atribuições.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Fontes bibliográficas
3500-3300	Elongação O-H de grupos hidroxilo de fenóis, álcoois e carbonilo, e elongação N-H de amidas e aminas	Droussi <i>et al.</i> , 2009; Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Lguirati <i>et al.</i> , 2005; Vergnoux <i>et al.</i> , 2011.
2925-2920	Elongação assimétrica C-H de grupos metilo e metileno de cadeias alifáticas	Droussi <i>et al.</i> , 2009; Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Lguirati <i>et al.</i> , 2005.
2855-2850	Elongação simétrica C-H de grupos metilo e metileno de cadeias alifáticas	Droussi <i>et al.</i> , 2009; Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Lguirati <i>et al.</i> , 2005.
1718-1714	Elongação C=O de grupos carboxilo e grupos carbonilo de aldeídos e cetonas	Droussi <i>et al.</i> , 2009; Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Fernandes <i>et al.</i> , 2010; Vergnoux <i>et al.</i> , 2011.
1626-1622	Elongação C=C aromática e elongação C=O de grupos amida (amida I) e quinonas	Droussi <i>et al.</i> , 2009; Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Fernandes <i>et al.</i> , 2010; Vergnoux <i>et al.</i> , 2011.
1460-1440	Deformação C-H em cadeias alifáticas	Droussi <i>et al.</i> , 2009; Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Golonka <i>et al.</i> , 2005.
1419-1414	Deformação O-H e elongação C-O de grupos fenóis	Droussi <i>et al.</i> , 2009;
1384-1382	Elongação assimétrica COO ⁻ e deformação C-H de grupos metilo e metileno	Droussi <i>et al.</i> , 2009;
1264-1260	Elongação C-O de ésteres arilo	Droussi <i>et al.</i> , 2009;
1227-1220	Elongação C-O de éteres arilo e fenóis	Droussi <i>et al.</i> , 2009;
1128	Elongação C-O de álcoois secundários	Droussi <i>et al.</i> , 2009;
1047-1044	Elongação C-O de polissacarídeos e moléculas com estrutura semelhante	Giovanela <i>et al.</i> , 2010; Fernandes <i>et al.</i> , 2010; Mengchang <i>et al.</i> , 2008.
975-775	Deformação C-H em anéis aromáticos	Lguirati <i>et al.</i> , 2005; Golonka <i>et al.</i> , 2005; Mengchang <i>et al.</i> , 2008.

Nas substâncias húmicas espera-se que existam todos estes tipos de vibrações, e as suas frequências de sinais podem-se sobrepor nesta região, sendo os desvios para a direita ou esquerda o resultado da influência relativa de cada grupo. Por exemplo, pensa-se que a absorção C=C aromática é responsável por esta banda em materiais derivados da lenhina, enquanto a banda da amida I pode ser predominante para materiais proteicos. Neste caso, a banda observada aproximadamente a 1626 cm^{-1} parece estar associada principalmente a vibrações de grupos C=C. Além disso, nenhum dos espectros apresenta bandas características da amida II (deformação N-H a $1540\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$). Esta banda tem estado associada a estruturas derivadas de polipéptidos, que aparentemente estão em baixas quantidades nas amostras de ácidos húmicos estudadas (Giovanela *et al.*, 2010).

A região entre $1500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ é muito complexa e difícil de interpretar porque várias vibrações dão origem a bandas nesta zona: elongação C-O de álcoois, ácidos, fenóis e grupos éster, deformações O-H de álcoois e grupos carboxílicos, entre outras. Além disso, estes modos de vibração são fortemente acoplados entre eles não apresentando domínios de frequência muito característica (Vergnoux *et al.*, 2011). Contudo, podem se fazer algumas atribuições. As bandas na região $1460\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ devem se à deformação C-H em cadeias alifáticas, a deformações O-H, elongação C-O de grupos fenóis e elongação O-C-O em grupos COO^- . Absorvências na região $1270\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$ correspondem à elongação C-O de vários grupos oxigenados.

A banda na zona $1047\text{-}1044\text{ cm}^{-1}$ tem sido atribuída à elongação C-O de polissacarídeos e moléculas com estrutura semelhante. A maior intensidade destas bandas num espectro de FTIR de ácidos húmicos pode estar relacionada com a decomposição de celulose (Giovanela *et al.*, 2010). Na região $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, os ácidos húmicos mostraram alguma absorvência que pode ser atribuída à deformação C-H de anéis aromáticos.

Nas figuras 3.8 e 3.9 encontram-se mais uma vez os espectros de infravermelho obtidos para as amostras em estudo, mas desta vez com ênfase para as zonas $3600\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ e $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ respetivamente.

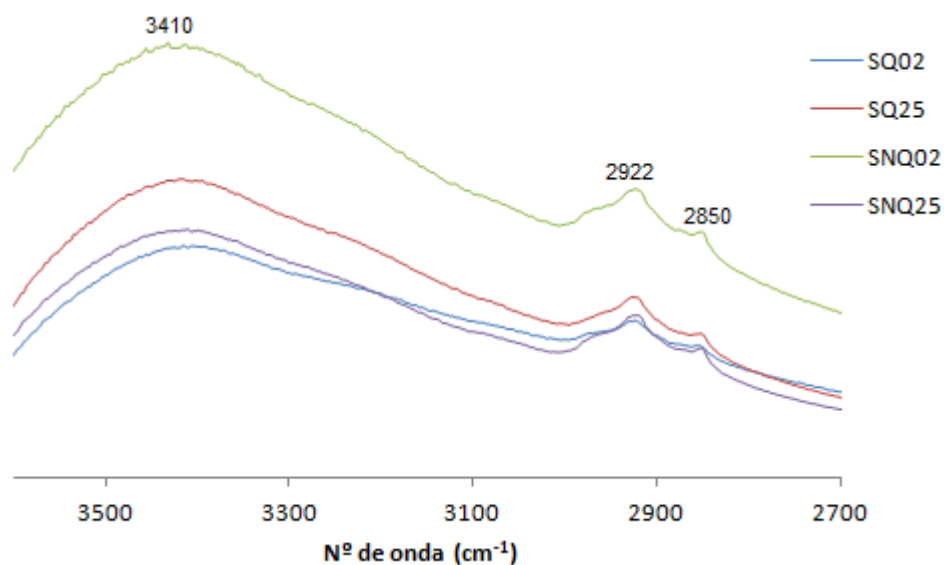


Figura 3.8 – Espectros de FTIR das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25). Gama 3600-2700 cm^{-1} .

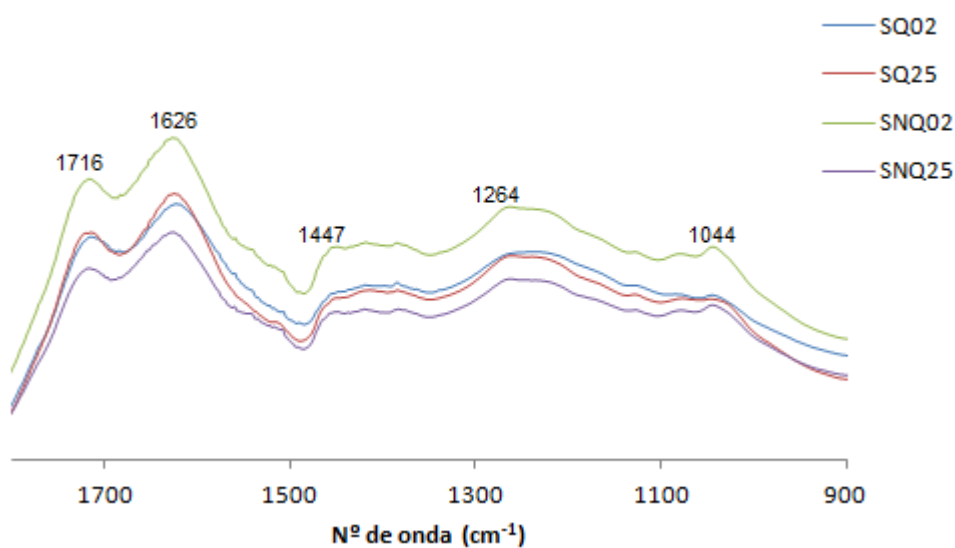


Figura 3.9 – Espectros de FTIR das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25). Gama 1800-900 cm^{-1} .

Comparando os espectros da figura 3.8, observa-se que as amostras têm os espectros muito semelhantes, com exceção da amostra de ácidos húmicos de solo queimado de profundidade 0 a 2 cm, que apresenta as 3 bandas (3500-3300 cm^{-1} , 2925-2920 cm^{-1} e 2855-2850 cm^{-1}) com menor intensidade. A primeira banda corresponde a

elongações O-H e elongações N-H, e a segunda e a terceira devem-se, respetivamente, à elongação assimétrica e simétrica de grupos metilo e metileno de cadeias alifáticas. Assim, verifica-se que o impacto do fogo se fez notar sobretudo na camada mais superficial, de 0 a 2 cm, ocorrendo perda de grupos hidroxilo e de unidades estruturais alifáticas.

Na zona 1800-900 cm^{-1} , representada na figura 3.9, as diferenças já não são tão notáveis pois os espectros são muito semelhantes. Devido à perda de unidades alifáticas causada pelo fogo, a banda 1626-1622 cm^{-1} (elongação C=C aromática e elongação C=O de grupos amida e quinonas) deveria ter maior intensidade na amostra SQ02, mas não é o que se verifica. Observando os espectros com atenção encontram-se apenas 3 diferenças principais. A banda 1460-1440 cm^{-1} (deformação C-H em cadeias alifáticas) tem menor intensidade na amostra SQ02, confirmando a perda de unidades alifáticas. Outra diferença é a ausência de uma banda a 1264-1260 cm^{-1} (elongação C-O de ésteres arilo) na amostra SQ02, o que indica possivelmente que o fogo levou à perda deste tipo de estruturas. E por fim, a banda 1047-1044 cm^{-1} (elongação C-O de polissacarídeos e moléculas com estrutura semelhante) apresenta menor intensidade para ambas as amostras de solo queimado, SQ02 e SQ25, verificando-se assim que os ácidos húmicos das amostras de solo queimado apresentam na sua estrutura menos polissacarídeos do que os ácidos húmicos provenientes de solo não queimado.

3.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^{13}C das amostras em estudo estão representados na figura 3.10, e as suas áreas relativas, obtidas por integração, apresentam-se na tabela 3.4. Oito regiões de desvios químicos foram considerados nestes espectros: $R_1=0-45$ ppm (região alifática), $R_{2a}=45-60$ ppm (grupos metoxilo em lenhinas e polissacarídeos/hemiceluloses, C *N*-alquilo), $R_{2b}=60-90$ ppm (C *O*-alquilo em álcoois superiores, C-2 a C-5 de hexoses), $R_{2c}=90-110$ ppm (C di-*O*-alquilo, C-1 anomérico em polissacarídeos, C-2 a C-6 em unidades siringilo, C-2 em unidades guaiacilo), $R_{3a}=110-140$ ppm (C-C e C-H aromáticos, carbonos oleofínicos), $R_{3b}=140-160$ ppm (C-O aromático e grupos C-N), $R_4=160-190$ ppm (C de grupos carboxilo, amida e éster em lípidos e proteínas) e $R_5=190-220$ ppm (C em grupos carbonilo de aldeídos e cetonas) (Lima *et al.*, 2009).

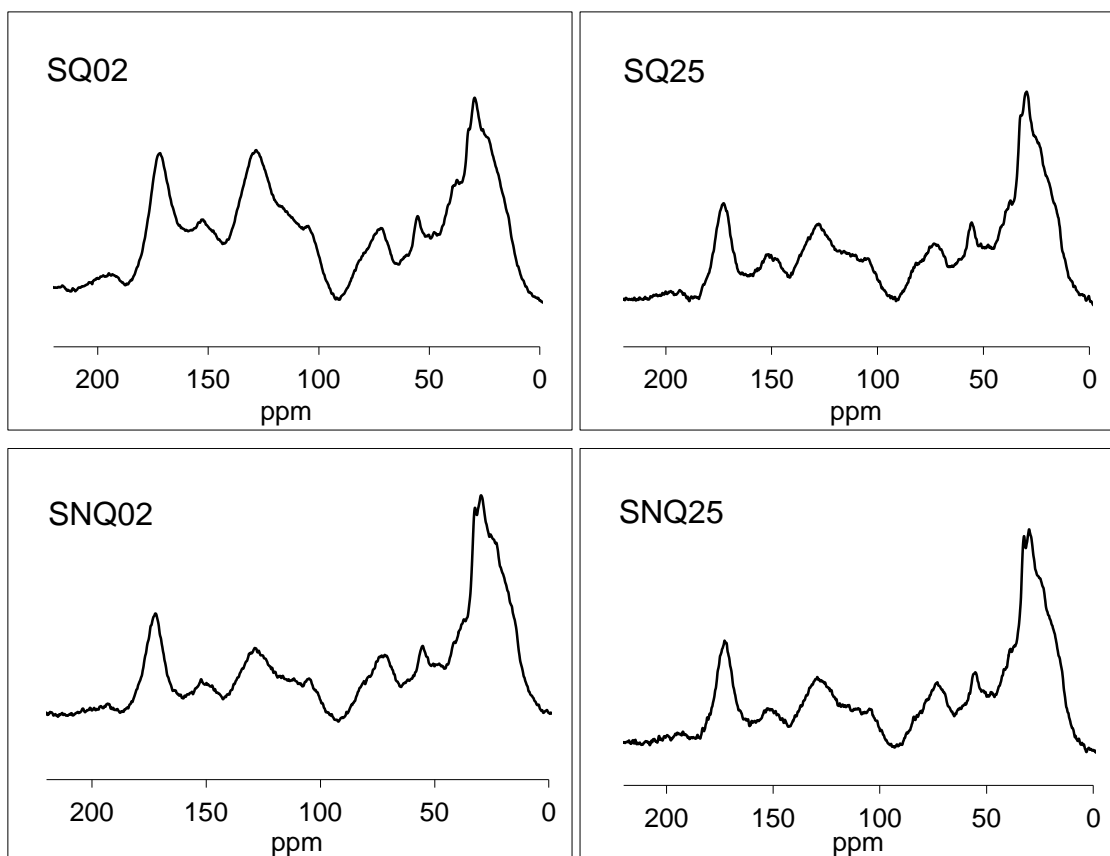


Figura 3.10 – Espectros de RMN de ^{13}C das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).

Como se pode verificar pela observação dos espectros, estes apresentam os mesmos picos, mas com intensidades diferentes.

Na região do carbono alifático, os sinais entre 20 e 40 ppm são atribuídos aos grupos metilo, metileno e metino, com o centro a 30 ppm. O facto de o centro ser a 30 ppm sugere a presença de grupos metileno em cadeias alifáticas longas, com uma possível contribuição de estruturas lipídicas e proteicas (Xiaoli *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009). Comparando as áreas relativas na região 0-45 ppm, conclui-se que a amostra SQ02 foi a mais influenciada pelo fogo, sugerindo uma estrutura com cadeias menos ramificadas que as outras amostras.

Tabela 3.4- Distribuição relativa das áreas (% total do espectro) dos espectros de RMN de ^{13}C das amostras SQ02, SQ25, SNQ02 e SNQ25.

Solo	Alquilo	O, N-alquilo				Aromático			Carboxilo	Carbonilo
	R1	R2	R2a	R2b	R2c	R3	R3a	R3b	R4	R5
	0-45	45-110	45-60	60-90	90-110	110-160	110-140	140-160	160-190	190-220
SQ02	27,8	22,6	6,6	9,7	6,3	29,2	20,0	9,2	14,7	5,7
SQ25	36,5	24,9	8,1	11,4	5,4	22,9	15,6	7,3	11,7	4,0
SNQ02	39,5	23,7	7,7	11,4	4,6	20,0	13,9	6,1	12,4	4,4
SNQ25	37,8	24,5	8,1	11,7	4,7	20,8	14,4	6,4	12,8	4,3

Na região entre 45 e 60 ppm encontra-se um sinal a 55 ppm que é usualmente atribuído a grupos metoxilo associados a lenhinas e a substâncias com estrutura semelhante. Os picos a 72 e 104 ppm correspondem a ressonâncias de carbonos em anéis de polissacarídeos e a carbonos anoméricos em polissacarídeos. A amostra SQ02 apresenta menor área relativa na região entre 60 e 90 ppm, sugerindo um menor conteúdo em polissacarídeos (Lima *et al.*, 2009), o que também já se tinha confirmado com a análise dos espectros de infravermelho. Isto é de esperar pois a queima dos solos reduz os resíduos frescos nos solos que contêm materiais de fácil decomposição (Kavdir *et al.*, 2005). Verifica-se também que a amostra SQ02 é a que apresenta menor quantidade de O-alquilo, o que está em concordância com o facto de os solos que sofrem incêndios perderem grupos externos com oxigénio, embora isto não se tenha notado para grupos carboxilo e carbonilo.

Na região do carbono aromático, os espectros indicam uma variedade de substituintes nos anéis aromáticos. O pico a 130 ppm deve-se à presença de carbonos aromáticos e insaturados, enquanto o pico a 152 ppm deve-se a carbonos ligados a fenóis e outros anéis aromáticos substituídos com carbono, oxigénio ou azoto. Considerando o sinal do metoxilo (55 ppm) e o sinal fenólico a 152 ppm, pode-se concluir que a lenhina é a estrutura aromática predominante (Xiaoli *et al.*, 2007).

O último pico encontra-se a 172 ppm e é normalmente atribuído a grupos funcionais carboxilo, amida e éster. Este pico é mais intenso para a amostra SQ02 (o que se

pode verificar também pela área relativa), sugerindo um maior conteúdo neste tipo de grupos orgânicos (Lima *et al.*, 2009).

Tabela 3.5 – Valores percentuais de aromaticidade e alifaticidade para as amostras de SQ02, SQ25, SNQ02 e SNQ25.

Amostra	% Aromaticidade	% Alifaticidade
SQ02	36,7	63,3
SQ25	27,2	72,8
SNQ02	24,0	76,0
SNQ25	25,0	75,0

A aromaticidade das amostras foi calculada expressando o nível de C aromático como percentagem do somatório do conteúdo em C aromático (110-160 ppm) e C alifático (0-110 ppm).

$$Aromaticidade = C(\delta_{110-160} / C(\delta_{0-160})) \times 100\%$$

onde δ (ppm) é o desvio químico, C é o conteúdo de grupos funcionais com C. A alifaticidade das amostras foi calculada expressando o C alifático como percentagem do C alifático (0-110 ppm) e do aromático (110-160 ppm) (Mengchang *et al.*, 2008).

$$Alifaticidade = C(\delta_{0-110} / C(\delta_{0-160})) \times 100\%$$

O índice de aromaticidade é uma forma de estimar o grau de decomposição da matéria orgânica dos solos. Maiores valores de aromaticidade indicam maior humificação (Kavdir *et al.*, 2005). A tabela 3.5 sugere que os ácidos húmicos das amostras de solo queimado (principalmente a da camada de 0 a 2 cm, a mais afetada pelo fogo) são mais parecidos com matéria orgânica mais humificada que os das amostras de solo não queimado, suportando a teoria que os ácidos húmicos tornam-se mais aromáticos com a decomposição.

Comparando as áreas relativas dos espectros de RMN ^{13}C das amostras em estudo, conclui-se que o fogo praticamente só afetou a camada superior 0 a 2 cm, e os seus efeitos foram reações de desidratação e de condensação refletidas nos espectros de RMN-CPMAS ^{13}C com uma diminuição da área relativa das regiões alquilo e O-alquilo e um aumento da área relativa na região aromática (Tinoco *et al.*, 2006).

3.6 Espectroscopia de fluorescência molecular

Os espectros de emissão, com excitação a 360 nm, das amostras em estudo encontram-se na figura 3.11. Estes consistem numa banda larga com o pico centrado a 455 nm para a amostra SQ02, 480 nm para a amostra SQ25 e 505 nm para as amostras SNQ02 e SNQ25. Uma maior exposição ao fogo desvia claramente o máximo de emissão para comprimentos de onda mais baixos, como se verifica na amostra SQ02, com o pico ao comprimento de onda mais baixo. Entre os dois extremos está a amostra SQ25, também exposta ao fogo, mas como foi recolhida de uma camada interior não sofreu tantas alterações, o que se têm visto nos resultados anteriores. Por fim, as amostras que não foram queimadas têm o mesmo pico e a um comprimento de onda maior.

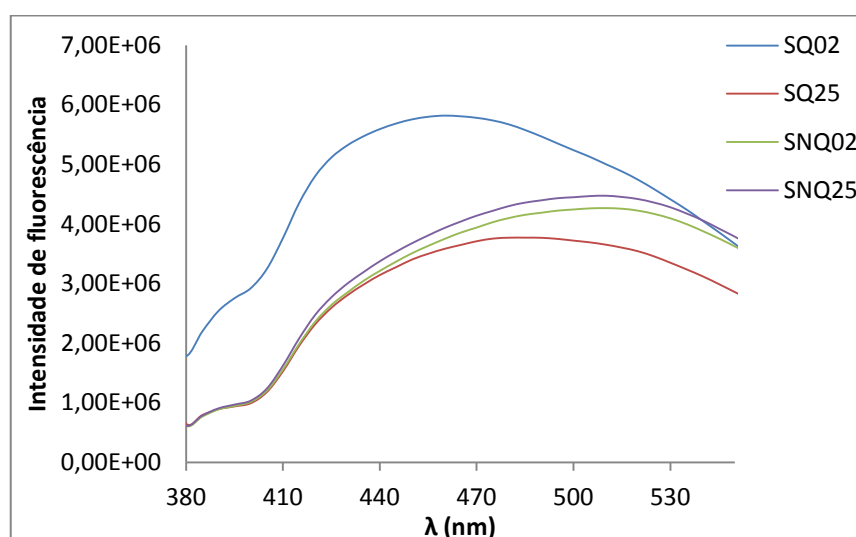


Figura 3.11 – Espectros de emissão com excitação a 360 nm das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).

Os espectros síncronos das amostras em estudo encontram-se na figura 3.12. Três bandas principais podem ser identificadas. A banda a 280 nm está associada com a presença de materiais proteicos e compostos mono aromáticos (Satín *et al.*, 2008). Esta banda, embora muito suave nas amostras SQ25, SNQ02 e SNQ25, é menos evidente na amostra SQ02, indicando uma menor quantidade ou ausência destes compostos na amostra mais exposta ao fogo, SQ02.

Os outros dois picos, a 340 e 380 nm, indicam a presença de compostos aromáticos policíclicos com 3 a 4 anéis de benzeno fundidos e/ou 2 a 3 sistemas conjugados em

estruturas alifáticas insaturadas (Satín *et al.*, 2008). A amostra SQ02 apresenta a banda a 340 nm mais intensa, indicando maior quantidade deste tipo de compostos, o que poderá estar relacionado com a maior aromaticidade desta amostra confirmada pelo RMN.

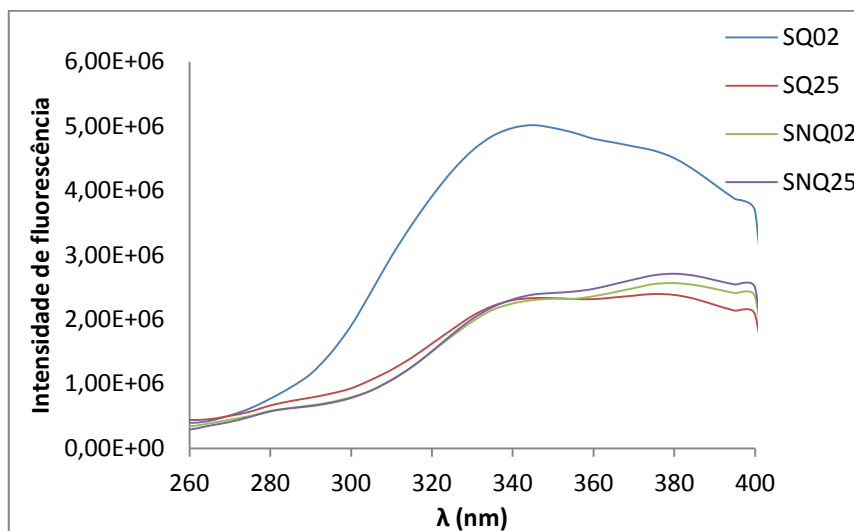


Figura 3.12 – Espectros síncronos com $\Delta = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 60$ nm das amostras de ácidos húmicos extraídos de solo queimado das camadas de 0 a 2 cm (SQ02) e de 2 a 5 cm (SQ25) e de ácidos húmicos extraídos de solo não queimado, também de camadas de 0 a 2 cm (SNQ02) e de 2 a 5 cm (SNQ25).

De acordo com Senesi *et al.* (1991), comprimentos de onda mais longos e menores intensidades medidas para os principais picos de fluorescência estão geralmente associados com o facto dos materiais húmicos terem um maior grau de humificação (Shirshova *et al.*, 2006).

A amostra SQ02 exibe maior intensidade de fluorescência em ambos os espectros de emissão e síncrono, e consequentemente, teria então menor grau de humificação. Outra evidência para este facto é o pico da amostra SQ02 no espectro de emissão estar deslocado para comprimentos de onda menores. Contudo, isto não foi o que se verificou com as outras técnicas utilizadas, pois com a termogravimetria, análise elementar, espectroscopia de UV-Vis e espectroscopia de RMN de ^{13}C conclui-se que a amostra SQ02 é a mais aromática.

Não se encontrou nenhuma explicação para estes resultados. Contudo, por outro lado, estes estão de acordo com a maior intensidade de absorvência da amostra SQ02

observada na espectroscopia de UV-Vis e pelo facto de compostos com sistemas aromáticos exibirem maior intensidade de fluorescência.

4. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo o estudo do impacto do fogo na estrutura da matéria orgânica, mais especificamente, na estrutura dos ácidos húmicos e estudar o efeito do fogo em profundidade sobre os ácidos húmicos.

O comportamento das diferentes amostras analisadas por termogravimetria permitiu identificar os ácidos húmicos mais resistentes termicamente, os ácidos húmicos da amostra de solo queimado da camada mais superficial, sugerindo um conteúdo mais aromático. A maior aromaticidade dos ácidos húmicos da amostra de solo queimado de 0 a 2 cm é também confirmada pela menor razão H/C e pela maior ϵ_{280} , obtidas por análise elementar e espectroscopia de UV-Vis respetivamente. Comparando os resultados, verifica-se que os ácidos húmicos da amostra de solo queimado de 2 a 5 cm apresentam mais semelhança com os ácidos húmicos das amostras de solo não queimado, indicando que o fogo teve um efeito mais acentuado na camada superior (0 a 2 cm).

Os espectros de FTIR também confirmam a perda de unidades estruturais alifáticas da amostra de ácidos húmicos de solo queimado de 0 a 2 cm juntamente com a perda de grupos hidroxilo. O mesmo se verifica nos espectros de RMN de ^{13}C com uma diminuição da área relativa das regiões alquilo e *O*-alquilo e um aumento da área relativa na região aromática.

Já os resultados obtidos com a espectroscopia de fluorescência molecular não estão de acordo com os resultados obtidos nas técnicas mencionadas anteriormente. Estes sugerem um menor grau de humificação para os ácidos húmicos de solo queimado de 0 a 2 cm, quando as outras técnicas sugerem o contrário. Não foi encontrada nenhuma explicação para este facto.

Tendo em conta os resultados obtidos com as várias técnicas utilizadas, é possível tirar duas conclusões gerais:

- 1) O fogo teve como consequência a perda de *C*-alquilo e *O*-alquilo e um aumento de aromaticidade.
- 2) A camada de 0 a 2 cm foi a mais influenciada pelo fogo pois a amostra de solo queimado da camada de 2 a 5 cm apresentava sempre resultados semelhantes aos das amostras de solo não queimado.

O efeito do fogo na matéria orgânica do solo é altamente dependente, entre outros fatores, do tipo e intensidade do fogo, do tipo de solo, e da natureza dos materiais queimados. Por isso, o seu impacto nos processos dos solos influenciados pelo fogo é altamente variável. Contudo, alterações sistemáticas têm sido verificadas em vários estudos, como a remoção geral de grupos com oxigénio externos, a redução do tamanho das cadeias de compostos alquilo e um aumento na aromaticidade (González-Pérez *et al.*, 2004). Estes efeitos foram observados neste trabalho, principalmente na camada superior, a mais exposta ao fogo.

5. Referências

IHSS (International Humic Substances Society, <http://www.ihss.gatech.edu/>) (último acesso em 29 de Dezembro de 2010).

Abbt-Braun, G., Lankes, U., Frimmel, F.H., 2004. Overview Article: Structural characterization of aquatic humic substances – The need for a multiple method approach. *Aquatic. Sciences* 66:151-170.

Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P., 1985. Humic substances in soil, sediment and water, John Wiley & Sons, USA.

Aiken, A.C., DeCarlo, P.F., Jimenez, J.L., 2007. Elemental analysis of organic species with electron ionization high-resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79: 8350-8358.

Alexis, M.A., Rumpel, C., Knicker, H., Leifeld, J., Rasse, D., Péchot, N., Bardoux, G., Mariotti, A., 2010. Thermal alteration of organic matter during a shrubland fire: A field study. *Organic Geochemistry* 41:690-697.

Andelkovic, T., Andelkovic, D., Perovic, J., Purenovic, M., Polic, P., 2001. Decrease of oxygen interference on humic acid structure alteration during isolation. *Physics, Chemistry and Technology* 2:163-171.

Bárcenas-Moreno, G., Baath, E., 2009. Bacterial and fungal growth in soil heated at different temperatures to simulate a range of fire intensities. *Soil Biology & Biochemistry* 41:2517-2526.

Barriquello, M.F., 2005. Influência de iões metálicos na estrutura de substâncias húmicas detectados por espectroscopia.

Certini, G., 2005. Effect of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143:1-10.

Chesworth, W., 2008. Encyclopedia of soil science, Springer, Netherlands.

Chilom, G., Bruns, A.S., Rice, J.A., 2009. Aggregation of humic acid in solution: Contributions of different fractions. *Organic Geochemistry* 40:455-460.

Chin, Y., Alken, G., O'Loughlin, E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* 28:1853-1858.

Chukov, S.N., Ryumin, A.G., Kechaikina, I.O., 2010. The fifth jubilee all-russian conference "Humic substances in the biosphere". *Eurasian soil science* 43:1062-1064.

Conte, P., Piccolo, A., 1999. Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environmental Science & Technology* 33:1682-1690.

Cozzolino, A., Conte, P., Piccolo, A., 2001. Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy-, keto-, and sulfonic acids. *Soil Biology & Biochemistry* 33:563-571.

Davis, W.M., Erickson, C.L., Johnston, C.T., Delfino, J.J., Porter, J.E., 1999. Quantitative fourier transform infrared spectroscopic investigation of humic substance functional group composition. *Chemosphere* 38:2913-2928.

Droussi, Z., D'Orazio, V., Hafidi, M., Ouattmane, A., 2009. Elemental and spectroscopic characterization of humic-acid-like compounds during composting of olive mill by-products. *Journal of Hazardous Materials* 163:1289-1297.

Engbretson, R.R., Wandruszka, R., 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environmental Science & Technology* 28:1934-1941.

Esteves, V.I., Duarte, A.C., 1999. Thermogravimetric properties of aquatic humic substances. *Marine Chemistry* 63:225-233.

Faria, S.R., 2008. Repelência à água em solos florestais queimados e não queimados na região Centro.

Farias, E.P., Zonta, E., Canellas, L.P., Santos, G.A., 2005. Aporte de carbono solúvel pelo sistema radicular de arroz e sua influência nos teores de substâncias húmicas de um Latossolo Vermelho-Amarelo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 29:875-882.

Fernandes, A.N., Giovanela, M., Esteves, V.I., Sierra, M.M.S., 2010. Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances. *Journal of Molecular Structure* 971:33-38.

Fernandez, I., Cabaneiro, A., Carballas, T., 2001. Thermal resistance to high temperatures of different organic fractions from soils under pine forests. *Geoderma* 104:281-298.

Fiorentino, G., Spaccini R., Piccolo, A., 2005. Separation of molecular constituents from a humic acid by solid-phase extraction following a transesterification reaction. *Talanta* 68:1135-1142.

Gieguzynska, E., Amine-Khodja, A., Trubetskoj, O.A., Trubetskaya, O.E., Guyot, G., Halle, A., Golebiowska, D., Richard, C., 2009. Compositional differences between soil humic acids extracted by various methods as evidenced by photosensitizing and electrophoretic properties. *Chemosphere* 75:1082-1088.

Giovanela, M., Crespo, J.S., Antunes, M., Adamatti, D.S, Fernandes, A.N., Barison, A., Silva, C.W.P., Guégan. R., Motelica-Heino, M., Sierra, M.M.D., 2010. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. *Journal of Molecular Structure* 981:111-119.

Golonka, I., Czechowski, F., Jezierski, A., 2005. EPR characteristics of heat treated complexes of metals with demineralised humic brown coal in air and ammonia atmospheres. *Geoderma* 127:237-252.

González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros, G., Knicker, H., 2004. The effect of fire on soil organic matter – a review. *Environment International* 30:855-870.

Granged, A.J.P., Zavala, L.M., Jordán, A., Bárcenas-Noreno, G., 2011. Post-fire evolution of soil properties and vegetation cover in a Mediterranean heathland after experimental burning: A 3-year study. *Geoderma* 164:85-94.

Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S., 1989. Humic substances II, John Wiley & Sons, UK.

Hayes, M.H.B., Wilson, W.S., 1997. Humic substances in soils, peats and waters, The royal society of chemistry, UK.

Janos, P., 2003. Review: Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A* 983:1-18.

Kavdir, Y., Ekinci, H., Yuksel, O., Mermut, A. R., 2005. Soil aggregate stability and ¹³C CP/MAS-NMR assessment of organic matter in soils influenced by forest wildfires in Çanakkale, Turkey. *Geoderma* 129:219-229.

Kholodov, V.A., Konstantinov, A.I., Belyaeva, E. Yu., Kulikova, N.A., Kiryushin, A.V., Perminova, I. V., 2009. Structure of humic acid isolated by sequential alkaline extraction from a typical chernozem. *Eurasian Soil Science* 42:1095-1100.

Kholodov, V.A., Konstantinov, A.I., Perminova, I.V., 2009. The carbon distribution among the functional groups of humic acids isolated by sequential alkaline extraction from gray forest soil. *Eurasian Soil Science* 42:1229-1233.

Killops, S.D., Killops, V.J., 2005. Introduction to organic geochemistry, Blackwell Science Ltd, UK.

Knicker, H., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González, J.A., Almendros, G., 2005. Fire-induced transformation of C- and N- forms in different organic soil fractions from a Dystric Cambisol under a Mediterranean pine forest (*Pinus pinaster*). *Soil Biology & Biochemistry* 37:701-718.

Koivula, N., Hanninen, K., 2001. Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stages of humification. *Chemosphere* 44:271-279.

Kuwatsuka, S., Watanabe, A., Itoh, K., Arai, S., 1992. Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS and NAGOYA method. *Soil Science and Plant Nutrition* 38:23-30.

Laird, D.A., Chappell, M.A., Martens, D.A., Wershaw, R.L., Thompson, M., 2008. Distinguish black carbon from biogenic humic substances in soil clay fractions. *Geoderma* 143:115-122.

Lguirati, A., Ait Baddi, G., El Mousadik, A., Gilard, V., Revel, J.C., Hafidi, M., 2005. Analysis of humic acids from aerated and non-aerated urban landfill composts. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56:8-16.

Lima, D.L.D., Santos, S. M., Scherer, H.W., Schneider, R.J., Duarte, A.C., Santos, E.B.H., Esteves, V.I., 2009. Effects of organic and inorganic amendments on soil organic matter properties. *Geoderma* 150:38-45.

Marcos, E., Tárrega, R., Luis, E., 2007. Changes in a Humic Cambisol heated (100-500 °C) under laboratory conditions: The significance of heating time. *Geoderma* 138:237-243.

Matilainen, A., Gjessing, E.T., Lahtinen, T., Hed, L., Bhatnagar, A., Sillanpaa, M., 2011. An overview of the methods used in the characterization of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* 83:1431-1442.

Mendonça, A., Duarte, A.C., Santos, E.B.H., 2004. Spectroscopic properties of sedimentary humic acids from a salt marsh (Ria de Aveiro, Portugal): comparison of sediments colonized by *Halimione portulacoides* (L.) Aellen and non-vegetated sediments. *Biogeochemistry* 69:159-174.

Mengchang, H.E., Yehong, S.H.I., Chunye, L.I.N., 2008. Characterization of humic acids extracted from the sediments of the various rivers and lakes in China. *Journal of Environmental Sciences* 20:1294-1299.

Mobed, J.J., Hemmingsen, S.L., Autry, J.L., McGown, L.B., 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: Total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science & Technology* 30:3061-3065.

Oliveira, A.P., 2009. Estratégias de extracção em química: substâncias húmicas em solos e cobre em cachaça.

Plante, F.A., Fernández, J.M., Leifeld, J., 2009. Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma* 153:1-10.

Pena-Méndez, E.M., Havel, J., Patocka, J., 2005. Review: Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of applied biomedicine* 33:13-24.

Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G., 1996. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*, 4:595-602.

Piccolo, A., Mirabella, A., 1987. Molecular weight distribution of peat humic substances extracted with different inorganic and organic solutions. *The Science of the Total Environment* 62:39-46.

Pospíšilová, L., Fasurová, N., Baranciková, G., Liptaj, T., 2008. Spectral characteristics of humic acids isolated from south moravian lignite and soils. *Petroleum & Coal* 50:30-36.

Prentice, A.J., Webb, E.A., 2010. A comparison of extraction techniques on the stable carbon-isotope composition of soil humic substances. *Geoderma* 155:1-9.

Richard, C., Coelho, C., Guyot, G., Shaloiko, L., Trubetskoj, O., Trubetskaya, O., 2011. Fluorescent properties of the <5 kDa molecular size fractions of a soil humic acid. *Geoderma* 163: 24-29.

Rocha, A.C.C., 2007. Análise crítica da aplicação da espectroscopia de fluorescência molecular à caracterização da matéria orgânica natural.

Rosa, A.H., Oliveira, L.C., Bellin, I.C., Rocha, J.C., Romão, L.P.C., Filho, N.L.D., 2005. Influence of alkaline extraction on the characteristics of humic substances in Brazilian soils. *Thermochimica Acta* 433:77-82.

Satín, C., González-Pérez, M., Otero, X.L., Vidal-Torrado, P., Macías, F., Álvarez, M.Á., 2008. Characterization of humic substances in salt marsh soils under sea rush (*Juncus maritimus*). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79:541-548.

Satín, C., Knicker, H., Fernández, S., Menéndez-Duarte, R., Álvarez, M.A., 2008. Wildfires influence on soil organic matter in Atlantic mountainous region (NW of Spain). *Catena* 74:286-295.

Schnitzer, M., Khan, S.U., 1978. Soil organic matter, Elsevier Science Publishers B.V., Netherlands.

Shirshova, L.T., Ghabbour, E.A., Davies, G., 2006. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma* 133:204-216.

Shirshova, L.T., Kholodov, A.L., Zolotareva, B.N., Fominykh, L.A., Yermolayev, A.M., 2009. Fluorescence spectroscopy studies of humic substances fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutin coastal lowlands. *Geoderma* 149:116-123.

Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J., 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58:715-733.

Smith, B.C., 2011. Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy, CRC Press, USA.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. Principles of instrumental analysis, Saunders College Publishing, USA.

Sparks, D.L., 2003. Environmental soil chemistry, Elsevier Science, USA.

Stevenson, F.J., 1994. Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions, John Wiley & Sons, USA.

Stevenson, F.J., Cole, M.A., 1999. Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients, John Wiley & Sons, USA.

Stuart, B., 1997. Biological applications of infrared spectroscopy, John Wiley & Sons, USA.

Tinoco, P., Almendros, G., Sanz, J., González-Vásquez, R., González-Vila, F. J., 2006. Molecular descriptors of the effect off fire on soils under pine forest in two continental Mediterranean soils. *Organic Geochemistry* 37:1995-2018.

Vergnoux, A., Di Rocco, R., Domeizel, M., Guiliano, M., Doumenq, P., Théraulaz, F., 2011. Effects of forest fires on water extractable organic matter and humic substances from Mediterranean soils: UV-vis and fluorescence spectroscopy approaches. *Geoderma* 160:434-443.

Vergnoux, A., Guiliano, M., Di Rocco, R., Domeizel, M., Théraulaz, F., Doumenq, P., 2011. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research* 111:205-214.

Wershaw, R.L., 1993. Model for humus in soils and sediments. *Environmental Science & Technology* 27:814-816.

Xiaoli, C., Shimaoka, T., Xiaoyan, C., Qiang, G., Youcai, Z., 2007. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere* 69:1446-1453.

Zaccone, C., Cocozza, C., D'Orazio, V., Plaza, C., Cheburkin, A., Miano, T.M., 2007. Influence of extractant on quality and trace elements content of peat humic acids. *Talanta* 73:820-830.

Zbytniewski, R., Buszewski, B., 2001. Speciation of natural organic carbon in terrestrial systems. XVI-th ARS Separatoria – Boróno, Poland 2001.